

THESIS

MÜNCHEN

1966

**Studien über Wirkungen
der Hämolyse auf die Blutgerinnung
und methodische Untersuchungen über
den Prothrombinverbrauch unter
verschiedenen Oberflächenbedingungen**

Stefan Silbernagl

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PABLO AVENUE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154017_0133

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

Studien über Wirkungen der Hämolyse auf die Blutgerinnung
und methodische Untersuchungen über den Prothrombinverbrauch
unter verschiedenen Oberflächenbedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Stefan Silbernagl
aus
Berlin

München 1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 1966

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Herrn Professor Marx danke ich
für die Überlassung des Themas
und die stets freundliche
Unterstützung der Arbeit.

Inhaltsübersicht

A. Einleitung	1
B. Experimenteller Teil	
1. Welche Methode zur Prothrombinverbrauchs- bestimmung gestattet es, Serum- und Plas- maprothrombingehalt unter möglichst glei- chen Bedingungen zu messen und damit zu- einander in Beziehung zu setzen?	
1.1 Die Serumprothrombinbestimmung. Methodik und Reagenzien	4
1.2 Die Plasmaprothrombinbestimmung. Methodik und Reagenzien	6
1.3 Vergleich der Prothrombingehalte in Serum und Plasma. Umrechnung des Pro- thrombingehalts in NIH-Einheiten Thrombin	9
2. Die mit der in Abschnitt 1 beschriebenen Methode gefundenen Werte für den Prothrom- bingehalt im Serum und im Plasma und für das eine bestimmte Zeit nach der Gerinnung verbleibende Restprothrombin	
2.1 Die Normalwerte	14
2.2 Die Werte bei Versuchspersonen mit Blut- gerinnungsstörungen bei sich und in ihrer Familie	15
3. Der Prothrombinrest bei Kontakt von Human- blut mit verschiedenen Oberflächen	
3.1 Der Prothrombinrest in silikonierten bzw. paraffinierten Gläsern	16
3.2 Der Prothrombinrest in Kunststoff- zentrifugenröhrchen	21
3.3 Der Prothrombinrest bei Kontakt mit Schlauchstücken aus verschiedenen Kunststoffen	22

4. Der Einfluß von Hämolysat auf den Prothrombinverbrauch	
4.1 Die Herstellung des Hämolysats und die Isolierung seiner Bestandteile	26
4.2 Der Prothrombinrest beim Zusetzen von Erythrozyten-Hämolysat und seiner Bestandteile	28
5. Die Wirkungen des Erythrozyten-Vollhämolysats in vivo beim Kaninchen	
5.1 Die Messung der Gerinnungsfaktoren und der Thrombozytenzahl vor und nach Injektion des Hämolysats beim Kaninchen. . .	34
5.2 Prüfung der intravasalen Blutkoagulabilität nach Injektion des Hämolysats beim Kaninchen	39

C. Ergebnisse und Diskussion

1. Der Prothrombinverbrauchstest und die damit vorgenommenen Oberflächenstudien	43
2. Versuche mit Erythrozyten-Hämolysat	47

D. Zusammenfassung	61
------------------------------	----

E. Literatur	63
------------------------	----

"The fact that the stromata cause intravascular clotting is in many ways interesting; and I trust will lead to important conclusions regarding the causation of thrombosis during life."

Wooldridge 1886 (60)

A. E I N L E I T U N G =====

Das klinische Interesse an der Rolle der hämolysierten Erythrozyten bei der Blutgerinnung gründet sich auf die Beobachtung, daß bei intravasaler Hämolyse einerseits die Thrombosebereitschaft erhöht ist, andererseits eine gesteigerte Blutungsneigung bestehen kann.

So ist bekannt, daß bei einigen hämolytischen Anämien eine deutliche Thrombophilie besteht (MARX (30)). SCOTT, ROBB-SMITH und SCOWEN (49), sowie ELLENHORN et al. (14) berichten über autoptisch gesicherte venöse Thrombosen bei der Marchiafava-Anämie, ja einige Autoren (HAM und HORACK (20), PERKINS et al. (38)) sogar über arterielle Thrombosen bei letzterer Erkrankung.

Es darf dabei aber nicht außer Acht gelassen werden,

daß diese Thrombophilie nicht nur durch die Hämolyse der Erythrozyten hervorgerufen werden kann. Auch die "nicht-hämolytische thromboplastische Aktivität" der roten Blutkörperchen bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (MC KELLAR und DAGIE (31)) und die abträgliche Wirkung einer stärkeren Anämie auf die Gefäßendothelien (NEUDA (34)) wirken thrombosebegünstigend.

Bei den Transfusionszwischenfällen mit akuter massiver intravasaler Hämolyse wurden immer wieder illustrative Fälle bekannt, bei denen sich sowohl autoptisch multiple (meist Mikro-) Thrombosen (RATNER (43), WAHLE und MUIRHEAD (53)) als auch eine starke Blutungsneigung zeigten (ASTROW (2), LEVINE et al. (28), PARR und KRISCHNER (35), ABRAMSON (1), WIENER (59), FRIESEN et al. (15), MUIRHEAD (32), HARDAWAY et al. (21)). Bei diesen Patienten konnte fast immer eine Afibrinogenämie gesichert werden, von der anzunehmen ist, daß sie durch die vorangegangene disseminierte intravasale Gerinnung entstand.

Nach diesen Befunden ist es auch denkbar, daß die Einschwemmung unverträglicher kindlicher Erythrozyten in den mütterlichen Kreislauf bei manchen Venenthrombosen im Wochenbett eine Rolle spielen könnte (MARX (30)), zumal Hämolysat aus Nabelschnurblut besonders gerinnungsaktiv ist (DESMET et al. (8), KÜNZER (25)).

Herr Prof. Dr. R. Marx, Leiter des hämostaseologischen Labors der I. Medizinischen Universitätsklinik München,

stellte mir nun zur Aufgabe, auf der Grundlage bewährter Plasma- und Serum-Prothrombinbestimmungen einen Zweiphasen-Prothrombinverbrauchs-Test auszuarbeiten, um damit nach einer der Gefäßintima möglichst ähnlichen in-vitro-Oberfläche zu suchen und den Einfluß des Erythrozyten-Hämolysats auf die Blutgerinnung zu studieren.

Als Ergänzung dazu sollte ich in-vivo-Versuche mit Hämolysat beim Kaninchen anstellen.

Der in Kap. B, Abschn. 1. und 2., ausgearbeitete Prothrombinverbrauchstest erwies sich als sehr geeignet, die Oberflächenaktivität verschiedener Materialien bei der Gerinnung zu vergleichen. So wurden u.a. auch Kunststoffschläuche in dieser Beziehung geprüft. Da diese in Herz-Lungen-Maschinen, künstlichen Nieren etc. verwendet werden, bzw. werden können, erschien es interessant, welche dieser Oberflächen der Gefäßintima in Bezug auf die Gerinnungs-Kontakt-Aktivierung am ähnlichsten ist.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

- 1) Welche Methode zur Prothrombin-Verbrauchs-Bestimmung gestattet es, Serum- und Plasmaprothrombingehalt unter möglichst gleichen Bedingungen zu messen und damit zueinander in Beziehung zu setzen?

Die 2-Phasen-Serumprothrombinbestimmung nach SOULIER (51) und die 2-Phasen-Plasmaprothrombin-Bestimmung

nach RIEBEN-SCHULTZE (44, 46), modif. MARX (29), wurden jeweils so modifiziert, daß die Versuchsbedingungen praktisch identisch waren. So wurde bei beiden Bestimmungen mit möglichst gleichen ph-Werten, Temperaturen, Reagenzien, Mengen und Konzentrationen gearbeitet.

11) Serumprothrombinbestimmung; Methodik und Reagenzien:

111) Serum-Gewinnung:

Bei den Versuchspersonen wurden bei üblicher Stauung am Oberarm aus einer Cubitalvene mit einer V2a-Kanüle (silikoniert) etwa 3 ml Blut entnommen und verworfen. Nach Abnahme des Blutes für die Plasmaprothrombinbestimmung (s.u.) lief das Blut zur Gewinnung des Serums aus der Kanüle direkt in 16 x 100 mm Rundboden-Zentrifugengläser (Original SCHOTT), deren Oberflächenbehandlung im Abschnitt 2 näher beschrieben wird. In jedes Glas liefen 3 ml, zu deren Messung eine außen an den Teströhrchen angebrachte Markierung diente. Die Gläser wurden - mit einem Stöpsel versehen - nach der Blutabnahme sofort in ein thermostatisch geregeltes Wasserbad von 37°C eingebracht. Durch vorsichtiges Neigen der Gläser alle 30 sec wurde der Zeitpunkt des Eintritts der soliden Gerinnselbildung (Gelierung) gemessen. Genau

60' später erfolgte die Zentrifugierung (10 min bei 3.000 U.p.M.) der Teströhrchen, um sie anschließend weiter bei 37°C zu incubieren.

112) Messung des Prothrombins im Serum (s.auch Tab.1):

Etwa 6 bis 8 Teströhrchen (8 x 100 mm) werden in ein thermostatisch geregeltes Wasserbad von 37°C gehängt und mit jeweils 0,1 ml des nach Abschn. 111) bereiteten Serums⁺ und mit jeweils 0,15 ml Veronal-Puffer ph "7,2"⁺⁺ gefüllt (= Mischung S I). In einem weiteren Röhrchen (bei 37°C) wird eine Mischung im Verhältnis 2 : 1 von 4%iger Humanhirnthrombokinase (modif. nach QUICK) und 1/20 molarer CaCl₂-Lösung vorbereitet (= Mischung S II).

Die nun folgende Messung wurde bei jedem Versuch eine definierte Zeit nach Eintritt der soliden Gerinnungsbildung vorgenommen (wenn nicht anders angegeben, 75 min).

Zur Mischung S I kamen jeweils 0,15 ml der Mischung S II. Diesen Röhrchen wurde nun nach verschieden langer Inkubation (45", 60", 75"

⁺ Bei hohem Prothrombin-Rest (z.B. in Silikon-Gläsern oder bei Hämophilien) mußte das Serum verdünnt werden, da sonst die Proth.-Zeit nicht meßbar ist.

⁺⁺ = Mischung 1 : 1 aus Veronal-Puffer ph 6,7 und 7,6 (Behringwerke AG, Marburg)

u.s.f.) 0,2 ml 0,2%iges Rinder-Fibrinogen⁺) hinzupipettiert (S III). Die kürzeste ermittelte Gerinnungszeit der verschieden lang inkubierten Proben galt als Grundlage zur Berechnung des Serumprothrombins (s.u.). Dabei wird die Gerinnungszeit mit einer Stoppuhr vom Zeitpunkt des Zupipettierens von S III bis zum Hängenbleiben des ersten Gerinnsels an einem Rührhaken, der etwa alle 1/2" durch das Gemisch gezogen wird, gemessen (BAYERLE und MARX (3a)).

12) Plasmaprothrombin-Bestimmung; Methodik und Reagenzien:

121) Plasma-Gewinnung:

Unter den in Abschn. 111 erwähnten Bedingungen lief das Blut aus der Kanüle direkt in ein Rundboden-Zentrifugenglas (16 x 100 mm, Original SCHOTT) bis zu einer vorher außen am Glas angebrachten Markierung bei 5 ml Füllmenge. Um Verdünnungseffekte durch die übliche Na-Citrat-Lösung zu vermeiden, wurde Na-Citrat-Pulver (38 mg/5 ml Blut) im Glas vorgelegt, das mit einem Tropfen aqua dest. z.T. vorgelöst war, einer Menge, die die 5 ml Blut vernachlässigbar verdünnt (ca. 1 %). Zur sicheren Durchmischung muß das Glas jedoch

⁺) Behringwerke AG, Marburg/Lahn

öfter als gewöhnlich gestürzt werden.

Danach erfolgten die Zentrifugierung 10 min lang bei 3.000 U.p.m. und vorsichtiges Abpipettieren des überstehenden Plasmas.

122) Plasma-Prothrombinbestimmung (s. auch Tab. 1):

Das so gewonnene Plasma wurde 1 : 50 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt und davon 0,5 ml zusammen mit 1 ml Veronal-Puffer ph 7,6⁺) in einem Reagenzglas auf 37°C aufgewärmt (Mischung P I)

Ein weiteres Glas (dto. bei 37°C) enthält 1 ml 4%ige Humanhirn-Thrombokinase (modif. nach QUICK) und 0,5 ml 1/20 molare CaCl₂-Lösung (Mischung P II). Nach dem Zusammenschütten der Mischungen P I und P II wurden von diesem Zeitpunkt an nach jeder vollen minute 0,15 ml davon in etwa 6 - 8 vorbereitete Teströhrchen pipettiert, die jeweils 0,2 ml Rinder-Fibrinogen⁺) (0,2%ig) und 0,1 ml Veronal-Puffer ph 6,7⁺) enthielten (= Mischung P III).

Die Zeit, die vom letzten Zupipettieren bis zur Gerinnung verstrich, wurde mit Hilfe der Häkchenmethode (3a) gemessen und die kürzeste zur Plasma-Prothrombinbestimmung herangezogen (s.u.).

⁺) Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Tab. 1) Schema der Prothrombinbestimmung im Serum und im Plasma

(Alle Versuche im Wasserbad bei 37°C)

(Mengenangaben in ml)

Serum

ml

Plasma

ml

S I { 0,15 Puffer
ph 7,2
0,10 Serum

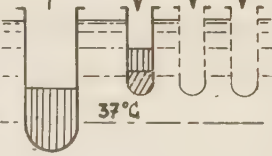


P I { 0,10 Puffer
ph 7,6
0,05 Plasma
1 : 50 ver-
dünnt

wird gemischt
mit:

wird gemischt
mit:

S II { 0,10 Thr.-
Kinase
(4%ig)
0,05 CaCl₂
1/20 mol

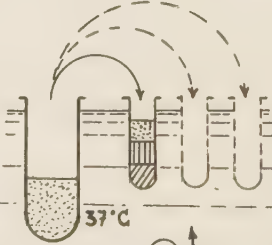


P II { 0,1 Thr.-
Kinase
(4%ig)
0,05 CaCl₂
1/20 mol

Jeweils 45",
60"...135"
danach Mi-
schung mit:

Jeweils 1',
2'...8'
danach Mi-
schung mit:

S III: 0,2 Fibri-
nogen
(0,2%ig)



P III { 0,2 Fibri-
nogen
(0,2%ig)
0,1 Puffer
ph 6,7

Messung der Zeit
bis zur Gerinnung

Messung der Zeit
bis zur Gerinnung

Kürzeste Gerin-
nungszeit wird
verwertet



Kürzeste Gerin-
nungszeit wird
verwertet

13) Vergleich der Prothrombingehalte im Serum und im Plasma; Umrechnung des Prothrombingehalts in NIH-E Thrombin

131) Aufstellung einer Eichkurve unter Verwendung von Thrombin.⁺⁾

Um vergleichen zu können, welcher Thrombinmenge die gemessenen Serum- und Plasmaprothrombinzeiten entsprechen, wurden in den Versuchsansatz der Tab. 1 statt Plasmaverdünnung bzw. Serum je 0,1 ml verschiedener Thrombin-Verdünnungen und statt des Thrombokinase- CaCl_2 -Gemisches 0,15 ml physiol. NaCl-Lösung eingeführt. (siehe Tab. 2).

Vom Thrombin⁺⁾ wurden mit aqua dest. etwa 15 verschiedene Verdünnungen hergestellt, die je ml 0,5 bis 30 NIH-E enthielten. Um einen zu raschen Aktivitätsverlust des Thrombin zu verhindern, standen die Verdünnungen im Eisbad.

Die mit dem in Tab. 2 gezeigten Ansatz erhaltenen Gerinnungszeiten sind in Abb. 1 (als Beispiel) gegen die verwendeten Thrombinkonzentrationen aufgetragen.

Bei der Aufstellung mehrerer dieser Eichkurven fiel auf, daß verschiedene Fibrinogenchargen etwas differierende Kurven ergaben. Es wurde deshalb für jede Charge eine eigene

⁺⁾ Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Elchkurve angelegt. Beim Thrombin traten diese Unregelmäßigkeiten in vernachlässigbar geringem Umfange auf.

Tab. 2) Schema des Versuchsansatzes zur Thrombinzeit-

Eichkurve (Näheres siehe Absatz 131)

0,2 ml Fibrinogen
0,2%ig

0,15 ml Veronal-Puffer
ph 7,2

0,15 ml physiolog. NaCl-
Lösung

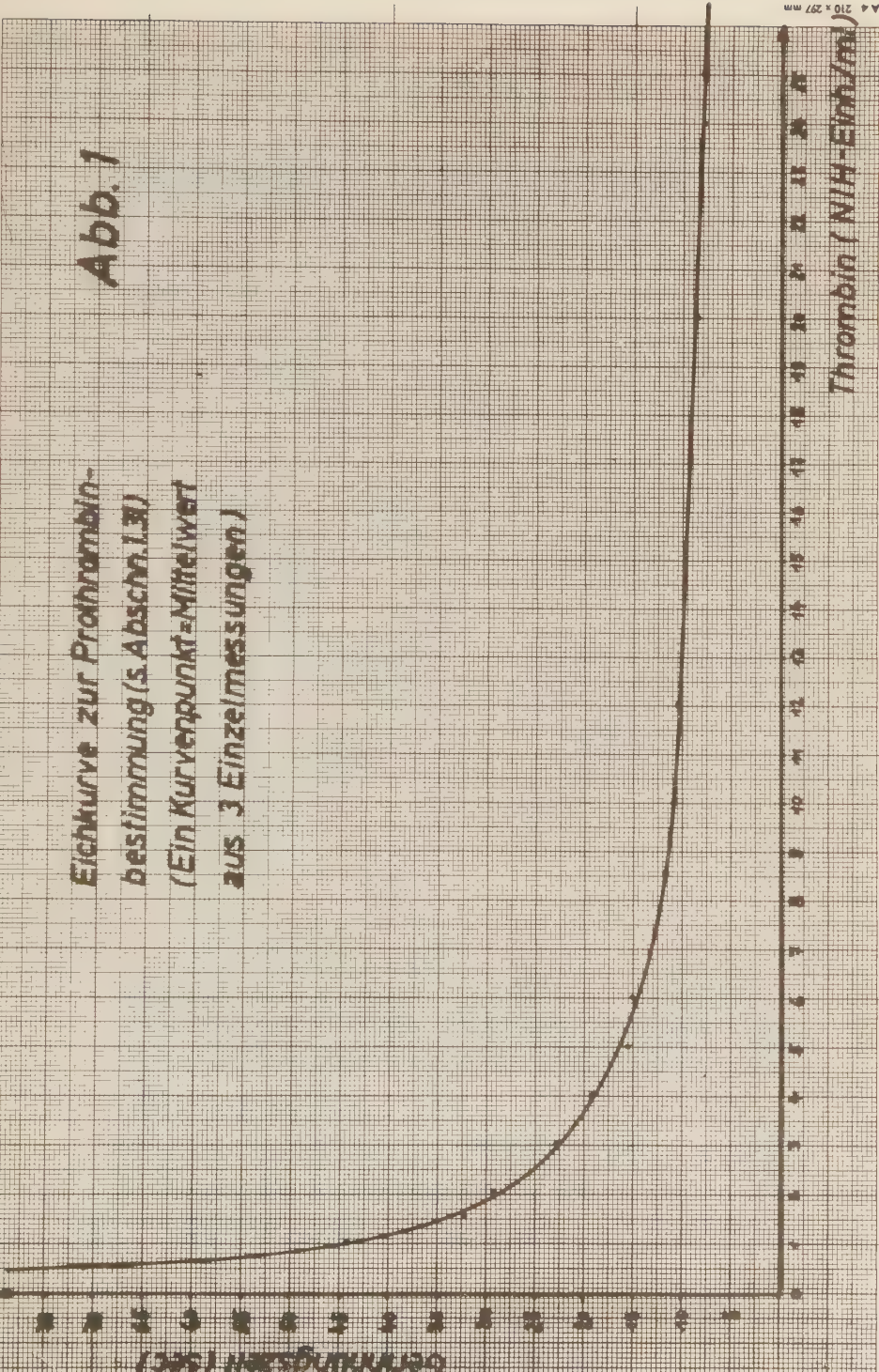
} + 0,10 ml Thrombinverdünnung
(von 0,5 bis 30
NIH-E/ml)

Messung der Gerinnungs-
zeit

Der ganze Versuch fand im Wasserbad bei 37°C statt. Die eisgekühlten Thrombinverdünungen wurden kurz vor dem Versuch erwärmt.

Eichkurve zur Prothrombin-
bestimmung (s. Abschn. 1.3)
(Ein Kurvenpunkt = Mittelwert
aus 3 Einzelmessungen)

Abb. 1



132) Berechnung des Serum- und Plasma-Prothrombins als NIH-Einheiten mit Hilfe der Eichkurve:

Die kürzeste Gerinnungszeit der verschiedenen lang inkubierten Versuchsansätze der Plasma- bzw. der Serumprothrombin-Bestimmung (Siehe Tab. 1) wurde zur Ablesung der NIH-E aus der Eichkurve herangezogen. Über die bei Normalpersonen und Patienten gefundenen Werte gibt Abschn. 2 Aufschluß.

133) Berechnung des Rest-Prothrombins:

Die im Plasma gefundenen Prothrombinwerte (ausgedrückt in NIH-E) wurden gleich 100 % gesetzt, wonach sich das noch im Serum vorhandene (=Rest-) Prothrombin leicht berechnen ließ. Die bei Versuchspersonen und Patienten gefundenen Werte finden sich in Abschnitt 2.

2) Die mit der in Abschnitt 1 beschriebene Methode gefundenen Werte für den Prothrombingehalt im Serum und im Plasma (in NIH-E) und für das eine bestimmte Zeit nach der Gerinnung verbleibende Restprothrombin (in %)

Bei den in Tab. 3 und Tab. 4 ausgewerteten Versuchen wurden nur fabrikneue, mehrmals gewaschene und 2 Stunden in destill. Wasser gekochte Rundbodenzentrifugengläser verwendet (16 x 100 mm, Original SCHOTT).

Gebrauchte Gläser oder solche, die nur herkömmlich gewaschen waren, ergaben bei Paralleluntersuchungen zu unterschiedliche Werte, als daß sie verwendet werden konnten.

Die Serumprothrombinmessung fand 75 min nach der Bildung eines soliden Gerinnsels statt.

Tab. 3) Serum- und Plasmaprothrombingehalt (in NIH-E/ml) und Prothrombinrest (in %) bei gesunden Versuchspersonen.

Versuchsperson	Geschl.	Serum-Prothr. (NIH-E Thromb.) /ml Serum	Plasma-Prothr. (NIH-E Thromb.) /ml Plasma	Prothrombin-Rest (in %)
1	weibl.	6,40	230	2,78
2	männl.	5,60	310	1,81
3	m.	4,85	250	1,94
4	m.	6,25	250	2,50
5	m.	3,47	160	2,17
6	m.	6,60	190	3,47
7	w.	12,00	350	3,43
8	m.	4,80	130	3,70
9	m.	3,31	170	1,94
10	m.	1,80	135	1,33
11	m.	2,50	135	1,85

Tab. 4) Serum- und Plasmaprothrombingehalt (in NIH-E/ml) und Prothrombinrest (in %) bei Versuchspersonen, die selbst oder deren Verwandte an Blutgerinnungsstörungen leiden.

Vers.- Pers.	Geschl.	Serum- Prothr. (NIH-E Thr./ml Serum)	Plasma- Prothr. (NIH-E Thr./ml Plasma)	Prothr.- Rest (in %)	Krankheit
I	m.	144,0	245,0	58,60	Hämo- philie A
II	w.	29,0	330,0	8,80	2 Söhne mit Hämo- philie A
III	w.	9,2	220,0	4,33	30.000 Thrombozyt.
IV	w.	1,8	150,0	1,86	2 Brüder mit Hämo- philie
V	m.	110,0	150,0	73,50	Hämo- philie A
VI	m.	15,0	170,0	9,70	6.000 TZ; Blutungs- zeit 13'

21) Die Normalwerte des Serum- und Plasmaprothrombingehaltes und des Prothrombinrestes (siehe auch Tab. 3).

Bei den in Tab. 3 verzeichneten Versuchspersonen, die keinerlei Anhalt für eine Blutgerinnungsstörung boten, errechnet sich ein durchschnittlicher Plasmaprothrombingehalt von 228 NIH-E Thrombin/ml Plasma.

(Maximalwert 350, Minimalwert 130). Der durchschnittliche Prothrombinrest betrug 2,45 % (Maximalwert 3,70, Minimalwert 1,33). Über die Häufigkeitsverteilung kann noch nichts ausgesagt werden, da dazu mindestens 100 Messungen gefordert werden.

22) Serum- und Plasmaprothrombingehalt und Prothrombinrest bei Versuchspersonen, die selbst oder deren Verwandte an Blutgerinnungsstörungen leiden (siehe auch Tab. 4).

Die Versuchspersonen I und V zeigen den sehr hohen Prothrombinrest der an Hämophilie Erkrankten. Deren Plasmaprothrombingehalt läßt keine signifikante Erhöhung gegenüber den Normalpersonen erkennen.

Die Versuchsperson VI hatte 6.000 Thrombozyten und eine subaquale Blutungszeit von 13'. Bei ihr fand sich ein deutlich erhöhter Prothrombinrest von 9,2 %; auch bei Versuchsperson III mit 30.000 Thrombozyten zeigte sich noch ein mit 4,33 % um ca. 0,6 % über dem höchsten Normalwert liegender Prothrombinrest.

Versuchsperson II ist eine sichere Anlageträgerin für die Hämophilie A (2 Söhne mit dieser Erkrankung). Bei ihr war der Prothrombinrest mit 8,8 % deutlich erhöht, ein Befund, der sich auch bei einer weiteren Anlageträgerin der Hämophilie A fand. Dies läßt weitere Untersuchungen der Anlageträgerinnen mit der erarbeiteten Methode aussichtsreich erscheinen.

Versuchsperson IV hat zwei Brüder mit Hämophilie A, ist also eventuelle Anlageträgerin für dieses Leiden. Sollte sich der etwas erhöhte Prothrombinrest bei Frauen mit Hämophilie-A-Anlage bestätigen, wäre Versuchsperson IV frei von diesem Gen.

3) Prothrombinverbrauch bzw. -rest bei Kontakt von Humanblut mit verschiedenen Oberflächen.

3.1. Der Prothrombinverbrauch in Glaszentrifugengläsern, deren Oberfläche silikoniert bzw. paraffiniert wurde.

Bisher gilt silikoniertes Glas als der unverletzten Gefäßintima ähnlichste Oberfläche, die in vitro bislang herzustellen ist, d.h., daß bei Berührung mit Nativblut Silikon am wenigsten von allen Intimaimitationen Kontaktfaktor aktiviert. Es wurden deshalb 5 verschiedene Arten der Silikonierung und die Paraffinierung, die der Silikonoberfläche bezüglich der Kontaktfaktor-Aktivierung nahe kommt, untereinander und mit unbehandelter Glasoberfläche verglichen. Mit diesen Versuchen sollte die Oberfläche gefunden werden, die den geringsten Kontakt für den Start der Blutgerinnung bietet; die in den vorigen Abschnitten beschriebene Bestimmung des Prothrombinrestes bot sich als Maßstab für diesen Oberflächenvergleich an.

3.11 Silikonierung A (= S_A):

4 Gewichtsteile "Wacker-Silikon-Öl AK 350"⁺) wurden in 100 Gew.-Teilen Toluol gelöst. Damit wurden die neuen und gekochten Rundbodenzentrifugengläser (siehe Abschn. 2), die Pipetten, Kanülen und Spritzen gut benetzt, bei 50°C 30 min getrocknet und anschließend zur Einbrennung des Silikons für 15 Std. im Sterilisator auf 200°C erhitzt. Dabei wurde peinlichst vermieden, daß Staub an die benetzten Glasoberflächen kam, ein Vorgehen, das auch für die folgenden Silikonierungen gilt.

3.12 Silikonierung B (= S_B):

Die Zentrifugengläser wurden für 30 min in unverdünntes "Wacker-Silikon-Öl AK 350"⁺) gelegt, anschließend nacheinander mit Leitungswasser, Azeton und aqua dest. gespült und danach für 1 Std. auf 220°C erhitzt. Wegen der hohen Viskosität des unverdünnten Silikon-Öls kam eine Behandlung der Pipetten, Kanülen und Spritzen damit nicht in Frage.

3.13 Silikonierung C (= S_C):

5 Vol.-Teile "Wacker-Silikon-Öl AK 350"⁺) wurden in 95 Vol.-Teilen Methyl-Äthyl-Keton gelöst. Nach 2-maligem Ein- und Ausgießen in bzw. aus

⁺) WACKER-Chemie, München

den Zentrifugengläsern (und den Pipetten etc.) dieser Lösung und Trocknung für 30 min bei 50°C wurden die Gläser innen maschinell mit einem Perlon-Krepp-Strumpf poliert und anschließend für 15 Std. auf 220°C erhitzt. Danach wurde die ganze Behandlung wiederholt.

3.14 Silikonierung D (= S_D):

Die Zentrifugengläser wurden bei dieser Methode mit "Wacker-Silikon-Lack HK 15"⁺⁾ , dem 1 Vol.% "Wacker-Silikon-Öl AK 350"⁺⁾ zugesetzt war, zweimal gefüllt und nach Entleerung 4 Std. lang bei 20°C getrocknet und anschließend für 15 Std. auf 50°C erhitzt. Eine höhere Einbrenn-Temperatur hatte Sprünge im Lack zur Folge.

Wegen der hohen Schichtdicke des Lackes ist diese Methode für Pipetten, Kanülen und Spritzen nicht geeignet.

3.15 Silikonierung E (= S_E):

15 Vol.-Teile "Wacker-Silikon-Emulsion E 1"⁺⁾ wurden mit 85 Vol-Teilen destilliertem Wasser verdünnt und die Zentrifugengläser, Pipetten etc. damit zweimal gut benetzt, danach 4 Std. bei 20°C getrocknet und für 15 Std. auf 220°C erhitzt.

⁺⁾ WACKER-Chemie, München

3.16 Paraffinierung:

Paraffinum solidum, Schmelzpunkt 68° bis 72°C , (Fa. Merck, Darmstadt) wurde auf etwa 80°C erwärmt, die Zentrifugengläser damit gefüllt und sofort wieder entleert. Nach dem Festwerden des Paraffins an der Glaswand wurde das Ein- und Ausgießen wiederholt.

Wegen der hohen Schichtdicke der Paraffinauskleidung kann diese Methode für Pipetten, Kanülen und Spritzen ebenfalls nicht verwendet werden.

Tab. 5 Prothrombinrest nach Gerinnung des Blutes in Gläsern, deren Oberfläche mit verschiedenen Methoden silikoniert bzw. paraffiniert wurde

Die Messung erfolgte 2 Std. nach Bildung eines soliden Gerinnsels.

Bei Silikonierung B und D wurden Pipetten, Kanülen und Spritzen verwendet, die nach Typ C silikoniert waren.

Oberfläche	Prothrombinrest (in %) 2 Std. nach der Gerinnung	
	Versuchsperson 22	23
Glas (s. Abschn. 2)	< 1,0	----
S _A	4,0	10,5
S _B	3,1	----
S _C	---	22,5
S _D	20	17
S _E	20	----
Paraffin	13,5	17

3.17 Ergebnis der Oberflächen-Prüfung an Hand des Prothrombinrestes:

Silikonierung A und B zeigen einen signifikant höheren Prothrombin-Verbrauch als die anderen Silikonierungen und das Paraffin. Letzteres und S_D zeigen zwar einen etwa gleich hohen Verbrauch wie S_C, die Gläser sind jedoch umständlich und ungenügend zu reinigen. S_E hat den Nachteil, daß sie nur etwa 48 Std. optimal bleibt.

Für die folgenden Versuche wurde deshalb S_C verwendet, da bei ihr der Prothrombin-Verbrauch mit am niedrigsten liegt und die Gläser auch noch nach einer Woche Lagerung einen praktisch gleich hohen Prothrombin-Rest zeigten.

Nach Ablauf dieser Woche wurden die Gläser, Pipetten etc., ob gebraucht oder ungebraucht, mit Leitungswasser und anschließend mit destill. Wasser gründlich gespült, getrocknet, poliert und nach Abschn. 3.13 einmal nachsilikoniert.

Die fertigen Gläser wurden, um sie vor Staub zu schützen, in einem verschlossenen Gefäß aufbewahrt.

3.2 Vergleich des Prothrombin-Verbrauchs in nach Typ C
silikon. Gläsern mit den in Zentrifugenröhrchen
aus Kunststoffen und Quarzglas

Zu diesem Vergleich fanden Zentrifugenröhrchen
Verwendung, die in Größe und Form den oben be-
schriebenen aus Glas praktisch glichen, jedoch aus

Hostalen (Polyäthylenart)

Akryl (Polyakrylsäure)

Quarzglas

gefertigt waren. Außer einer gründlichen Säuberung
mit aqua dest. wurde an ihnen keine weitere Vorbe-
handlung durchgeführt.

Die Meßergebnisse sind in Tab. 6 abzulesen.

Tab. 6 Vergleich des Prothrombin-Verbrauchs in Zentri-
fugenröhrchen aus verschiedenem Material:

Röhrchen-Material	Prothrombinrest (in %) 90' nach Gerinnung
Glas (s.Abschn. 2)	< 1,5
Quarzglas	ca. 2,5
Hostalen	18,0
Akryl	12,3
Silik. C auf Glas	28,2

Danach liegen die Werte für den Prothrombinrest bei Gerinnung in den Hostalen- und Akrylröhrchen weit über dem des Glases, erreichen jedoch lange nicht den Wert des Silikons (Typ C). Der Prothrombinverbrauch im Quarzglas war nur unbedeutend geringer als in Glas.

Die hier geprüften Materialien sind also nicht geeignet, den Prothrombinverbrauch/Zeit noch mehr zu senken als es in den nach Typ C silikonierten Gläsern schon erreicht wurde. Außerdem wurde beobachtet, daß - vielleicht durch die unvermeidlichen Kratzer bei der Reinigung - der Prothrombinverbrauch in den Kunststoffröhrchen, wenn sie längere Zeit in Benutzung waren, langsam anstieg.

3.3 Der Prothrombinverbrauch in Silikongläsern, in die während der Gerinnung Schlauchstücke aus verschiedenen Materialien eingelegt waren. (siehe auch Tab. 7)

3.31 In Versuchsanordnung I wurden Schlauchstücke aus

Teflon (Polyfluoräthylen)

PVC (Polyvinylchlorid)

Silikon-Kautschuk

verwendet, die der Länge nach vor dem Einlaufen des Blutes in silikonierte Gläser eingebracht wurden, so daß also auch das Schlauchinnere be-

netzt war. Parallel zu diesen 3 Gläsern wurden ein leeres Silikonglas und eines, in dem analog zu den Schläuchen ein Glarröhrchen stand, geprüft.

Die Schlauch- bzw. Glasröhrchendurchmesser betrugen außen/innen $3/2$ mm, die Länge war größer als die Füllhöhe im Silikonglas.

Das Gerinnsel wurde mit den Röhrcheneinlagen 1 Std. nach der Gerinnung aus dem Glas entfernt, die Messung des Prothrombinverbrauchs geschah jedoch erst 3 Std. nach der Bildung eines soliden Gerinnsels.

3.32 In Versuchsanordnung II wurden Schlauchstücke aus

PVC (Polyvinylchlorid)

Silikonkautschuk

und parallel dazu ein leeres silikoniertes Glas und ein solches mit eingelegtem silikonierten Glasröhrchen verwendet.

Bei diesem Versuch lagen die Schläuche u-förmig in den Zentrifugengläsern (das Glasröhrchen war zu einem U-Rohr gebogen worden), so daß das Blut diesmal nur die Außenflächen der Schläuche benetzen konnte.

Sonstige Versuchsbedingungen

siehe Abschn. 3.31

Tab. 7 Der Prothrombinverbrauch in Silikongläsern, in die während der Gerinnung Schlauchstücke aus verschiedenen Materialien eingelegt waren. (siehe auch Abschn. 3.3).

Prothr.-Verbrauchsmessung 3 Std. nach Bildung eines soliden Gerinnsels.

Gerinnsel und Rohr nach 1 Std. entfernt!

Versuchsanordnung I (Vers.-Person 27)		Versuchs- anordnung II (Vers.-Person 29)
Oberfläche	Prothr.- Rest (in %)	Prothr.- Rest (in %)
Silik.Glas, leer	11,45	6,85
dto. + Teflon	3,30	-----
dto. + PVC	2,90	1,20
dto. + Silik.-Kaut.	1,67	<1
dto. + Glas	1,12	----
dto. + silik. Glas	----	4,80

3.33 Ergebnisse der in den Abschnitten 3.31 und 3.32 beschriebenen Versuche (siehe auch Tab. 7).

Teflon und PVC zeigen mit 3,3 bzw. 2,9 ein deutlich höheres Restprothrombin als Glas (1,12 %), während dieser Effekt bei Verwendung

von Silikonkautschuk wider Erwarten nicht zu beobachten war. Der Silikongehalt dieses Materials bewirkt offenbar keine eindeutige Prothrombinverbrauchs- Erniedrigung.

In Versuchsanordnung II wurden diese Befunde bestätigt. Die hier mitlaufende Prüfung eines nach Typ C silikonierten U-Röhrchens ergab einen weit über den Werten der Kunststoffe liegenden Prothrombinrest, der jedoch nicht den im leeren Silikonglas erreichte. Dieser Unterschied ist vielleicht dadurch zu erklären, daß das U-Röhrchen die vom Blut während der Gerinnung benetzte Oberfläche etwa um den Faktor 1,7 vergrößert, ein Effekt, der natürlich auch in der Versuchsanordnung I in Tab. 7 berücksichtigt werden muß.

4. Der Einfluß von Hämolysat auf den Prothrombinverbrauch

4.1. Die Herstellung des Hämolysats und die Isolierung seiner Bestandteile. (Im wesentlichen nach QUICK (40))

4.11 Die Herstellung des Erythrozyten-Vollhämolysats (= V.-Häm.).

Durch Venenpunktion wurden 9 ml Blut gewonnen, dem 1 ml Na-Oxalat zugesetzt waren. Dabei fanden nur silikonierte Zentrifugengläser, Kanülen und Spritzen Verwendung. Nach der ersten Zentrifugierung für 5 min bei 1.000 U.p.M. wurde alles überstehende Plasma mit einer silikonierten Pipette abgenommen und durch die gleiche Menge physiol. NaCl-Lösung ersetzt. Nach guter Durchmischung durch Stürzen des Zentrifugenglases erfolgte eine erneute Zentrifugierung für 5 min bei 1.000 U.p.M. Das Abpipettieren und Zuschütten wurde noch 4-mal wiederholt, wobei jetzt dazwischen jeweils eine Zentrifugierung von 20 min bei 2.000 U.p.M. stattfand. Die sich bei dieser Tourenzahl bildende Speckhaut, die sich ja im wesentlichen aus Leukozyten zusammensetzt, wurde jedesmal möglichst vollständig mitentfernt.

Die thrombo- und leukozytenarme (bei mehrmaligen Zählungen fanden sich noch ca. 400 - 600 Leukos/mm³ des ursprünglichen Blutes) Erythrozythenaufschwemmung, deren Gesamtvolumen der

ursprünglichen Blutmenge entspricht, wurde nun für minimal 12 Std. bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen, das immer erst kurz vor der Verwendung geschah, fanden sich nur noch wenige intakte Erythrozyten, deren Anzahl dadurch noch mehr verringert werden konnte, daß nach dem letzten Zentrifugieren zur Auffüllung statt NaCl destilliertes Wasser verwendet wurde.

4.12 Die Trennung der Erythrozytenhäute von den anderen Bestandteilen der roten Blutkörperchen.

Das aufgetaute Voll-Hämolysat wurde in V2a-Zentrifugenbecher umgegossen und 10 min lang bei 12.000 U.p.M. zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde so vorsichtig abgessen, daß der Bodensatz - die Erythrozytenhäute - sich nicht ablöste.

Das so erhaltene Resthämolysat (= R.-Häm.) war sehr arm an Erythrozytenhäuten. Diese konnten durch Wiederholung des Zentrifugierens (10 min bei 12.000 U.p.M.) und erneutes Dekantieren noch weiter vermindert werden.

4.13 Die Aufbereitung der Erythrozytenhäute

Der in Abschnitt 4.12 erwähnte Bodensatz wurde in einer dem 4-fachen Volumen des ursprünglichen Blutes entsprechenden Menge physiologischer

NaCl-Lösung aufgeschwemmt, mit einem silikonierten Glasstab umgerührt, mehrmals gestürzt und anschließend 10 min bei 12.000 U.p.M. zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abschütten der überstehenden Flüssigkeit wurde diese durch die gleiche Menge physiologischer NaCl-Lösung ersetzt und nach erneutem Umrühren etc. das Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen wiederholt. Dieses Verfahren fand so lange Anwendung, bis die Waschflüssigkeit völlig klar blieb, d.h. der Waschvorgang mußte etwa 8 - 10 mal durchgeführt werden. Der Bodensatz war danach fast weiß geworden. Die beim ^{letzten} Mal möglichst vollständig abgenommene Flüssigkeit wurde nicht ersetzt, der Bodensatz 6 Std. an der Luft staubgeschützt getrocknet und anschließend bei -20°C eingefroren. Vor der Verwendung wurden die Erythrozytenhäute in der dem ursprünglichen Blutvolumen entsprechenden Menge physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt.

4.2 Der Prothrombinrest beim Zusetzen von Erythrozyten-Vollhämolysat und seiner Bestandteile zum Nativblut:

4.21 Vergleich des Prothrombinrestes mit und ohne Zusatz von "Rest"-Hämolysat:

Bei diesem Versuch wurde das "Rest"-Hämolysat

1 : 5 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. 0,5 ml dieser Lösung wurden mit Nativblut auf 3 ml aufgefüllt. In den Parallelversuchen fanden statt des "Rest"-Hämolysats 0,5 ml phys. NaCl-Lösung Verwendung.

Die Serum-Prothrombin-Messung wurde 120' nach Bildung eines soliden Gerinnsels vorgenommen.

Bei der Berechnung des Prothrombins ist die Verdünnung des Blutes berücksichtigt worden.

Wie aus den Versuchsergebnissen in Tab. 8 ersichtlich ist, bewirkt die Zusetzung von "Rest"-Hämolysat einen sehr viel kleineren Prothrombinrest im Silikonglas als ohne Zusatz im normalen Glas.

Tab. 8 Vergleich der Prothrombinreste mit und ohne Zusatz von "Rest"-Hämolysat. (siehe auch Abschnitt 4.21)

Oberfläche	Inhalt	Prothrombinrest (in %)
Glas (s. Abschn. 2)	2,5 ml Blut + 0,5 ml NaCl	1,85
Silikon Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml "Rest"- Häm. 1 : 5	0,50
Silikon Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml NaCl	9,70

4.22 Vergleich der Prothrombinreste bei Zusatz von
"Rest"-Hämolysat bzw. Erythrozyten-Häuten
(siehe auch Tab. 9 + 10)

Die Messung des Serum-Prothrombin-Restes fand 75 min nach Bildung eines soliden Gerinnsels statt. Außer der "Rest"-Hämolysat-Verdünnung 1 : 5 wurde auch eine solche 1 : 20 verwendet. Sonstige Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 4.21.

Aus den Tab. 9 + 10 ist zu ersehen, daß der Prothrombinrest beim Zusatz des 1 : 20 verdünnten "Rest"-Hämolysats im Silikonröhrchen zwar größer als der in Glas ist, jedoch den Wert bei NaCl-Zusatz im Silikonglas lange nicht erreicht.

Der Prothrombin-Rest bei Zusatz von unverdünnten Erythrozyten-Häute-Aufschwemmung ist ungefähr gleich (Tab. 9) bzw. größer (Tab. 10) als bei Verwendung des 1 : 20 verdünnten "Rest"-Hämolysats, erreicht aber auch lange nicht den Prozentsatz des NaCl-Kontrollwertes.

Das Ergebnis bei Verwendung des 1 : 5 verdünnten "Rest"-Hämolysats entspricht etwa dem in Abschn. 4.21.

(Die Versuchspersonen in Tab. 9 bzw. 10 sind nicht die gleichen.)

Tab. 9 + 10 Vergleich der Prothrombinreste bei Zusatz
von "Rest"-Hämolysat bzw. Erythrozytenhäuten
 (siehe auch Abschn. 4.22)

Oberfläche	Inhalt der Zentr.-Gläser	Prothr.- Rest (in %)
Glas (s. Abschn.2)	2,5 ml Blut + 0,5 ml phys. NaCl	1,94
Silikon, Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml "R"-Häm. 1 : 20	4,85
Silikon, Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml phys. NaCl	19,10
Silikon, Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml Häute in NaCl	4,00

Oberfläche	Inhalt der Zentr.-Gläser	Prothr.- Rest (in %)
Glas (s. Abschn.2)	2,5 ml Blut + 0,5 ml phys. NaCl	1,67
Silikon, Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml "R"-Häm. 1 : 20	2,69
Silikon, Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml phys. NaCl	17,60
Silikon, Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml Häute in NaCl	6,20
Silikon, Typ C	2,5 ml Blut + 0,5 ml "R"-Häm. 1 : 5	0,78

4.23 Der Prothrombinverbrauch bei Zusatz von "Rest"-
Hämolysat, Erythrozytenhäuten, Tachostyptan,
bzw. Chloroformhirnextrakt (= CHE).

Die Herstellung des Chloroformhirnextraktes (=CHE):

1 g Trocken-Humanhirn-Pulver (modif. nach QUICK) wurde in einem Erlenmeyer-Kolben (100 ml) mit 20 ml Chloroform aufgeschwemmt und bei öfterem Umrühren 20 min stehen gelassen. Nach dem anschließenden Durchfiltrieren wurden durch den gleichen Filter zur besseren Extrahierung nochmals 30 ml Chloroform nachgegossen. Nach dem Abdampfen des CHCl_3 konnte dann der eingetrocknete Rückstand in 50 ml physiol. NaCl-Lösung aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren werden.

Beim Versuch 4.23 wurde die Stammlösung des Chloroform-Hirnextraktes mit physiol. NaCl-Lösung 1 : 100 verdünnt; dasselbe geschah mit der handelsüblichen Tachostyptan-Lösung.^{+))}

Alle sonstigen Versuchsbedingungen sind in den vorigen Abschnitten beschrieben.

Aus Tab. 11 ist zu ersehen, daß der Prothrombinrest beim Zusatz des Chloroformhirnextraktes (1 : 100) und des Tachostyptans (1 : 100) unter diesen Versuchsbedingungen praktisch genau so

^{+))} HORMON-Chemie, München

hoch war wie im Parallelversuch mit NaCl, während die Werte beim Zusatz des "Rest"-Hämolysats und der Erythrozytenhäute denen in den vorigen Versuchen entsprachen.

Tab. 11 Der Prothrombinverbrauch beim Zusatz von "Rest"-Hämolysat (1 : 5), Erythrozytenhäuten, Tachostyp-tan, bzw. Chloroformhirnextrakt (=CHE).

Oberfläche	Inhalt der Zentrif.-Gläser	Prothr.- Rest (in %)
Glas	2,5 ml Blut + 0,5 ml phys. NaCl-Lösung	0,45
Silikon	2,5 ml Blut + 0,5 ml "R."- Häm. 1 : 5	< 0,35
Silikon	2,5 ml Blut + 0,5 ml phys. NaCl-Lösung	17,30
Silikon	2,5 ml Blut + 0,5 ml Tacho- styp. 1 : 100	> 17,00
Silikon	2,5 ml Blut + 0,5 ml CHE 1 : 100	> 17,00
Silikon	2,5 ml Blut + 0,5 ml Erythr.- Häute	2,75

5. Die Wirkung des Erythrozyten-Vollhämolysats in vivo
beim Kaninchen.

Das Erythrozyten-Vollhämolysat wurde nach der in Abschnitt 4.11 beschriebenen Methode hergestellt. Davon abweichend fanden jedoch 2 ml Natrium-Citrat je 8 ml Blut

(statt 1 ml Natrium-Oxalat je 9 ml Blut) Verwendung, und die Erythrozyten waren auch bei der letzten Auffüllung mit phys. NaCl-Lösung aufgeschwemmt.

Die Blutabnahme geschah, wie beim Kaninchen üblich, aus einer Ohrvene.

5.1 Messung der Gerinnungsfaktoren und Thrombozytenzahl vor und nach der Injektion von Erythrozyten-vollhämolysat beim Kaninchen.

Zuerst wurden mit einer nach Typ C (siehe Abschn. 3.13) silikonierten 5 ml-Rekord-Spritze, die 1 ml 3,8%ige Natrium-Citrat-Lösung enthielt, 4 ml Blut abgenommen, um anschließend 3 ml Blut direkt in ein Zentrifugenglas laufen zu lassen.

Durch die gleiche Kanüle, die silikoniert war, wurde nun das Erythrozyten-Voll-Hämolysat, dessen Menge 10 ml Nativblut entsprach, innerhalb von 2 min eingespritzt. (Jedem Versuchstier wurde sein eigenes Hämolysat injiziert).

20 min bzw. 30 min und 60 min nach dem Ende der Injektion wurde aus dem anderen Ohr des Kaninchens in der gleichen Weise Plasma und Serum gewonnen wie es vor der Einspritzung geschah und oben beschrieben ist.

Mit den so erhaltenen Blutproben wurden nun folgende Gerinnungstests durchgeführt:

Thrombozytenzählung im Phasenkontrast-
mikroskop (nach FEISSLY-LÜDIN, modifi-
ziert nach DERLATH (7))

Thrombinzeit-Bestimmung

Prothrombinzeit nach QUICK in der Modifi-
kation nach BAYERLE und MARX (4)

Prothrombinbestimmung nach Abschn. 1.22

Hitze-Fibrintest nach F. H. SCHULZ (48)

Faktor V - Bestimmung nach SCHULTZE und
SCHWICK (47)

Faktor VIII - Bestimmung nach GEIGER-DUCKERT-
KOLLER (17)

Faktor IX - Bestimmung nach GEIGER-DUCKERT-
KOLLER (17)

Abb. 2

Text siehe Abschn.
5.1

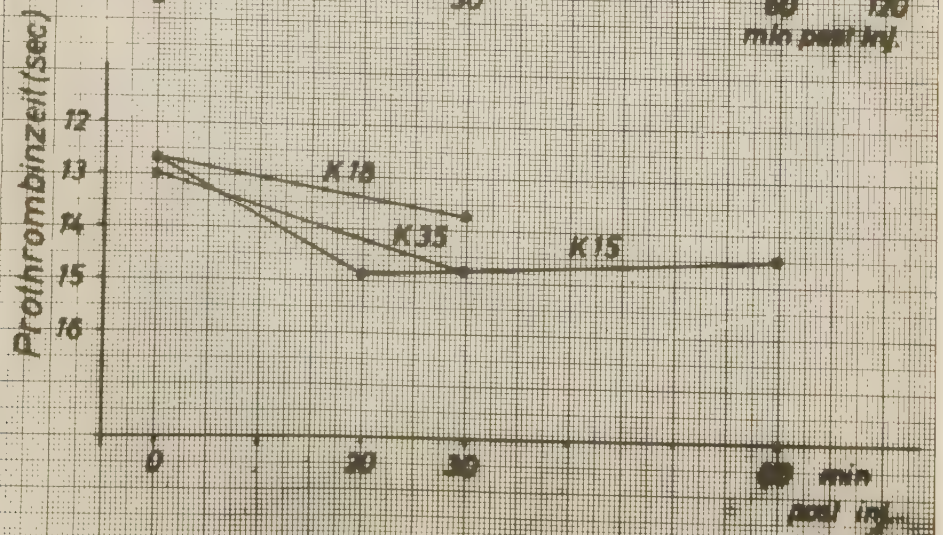
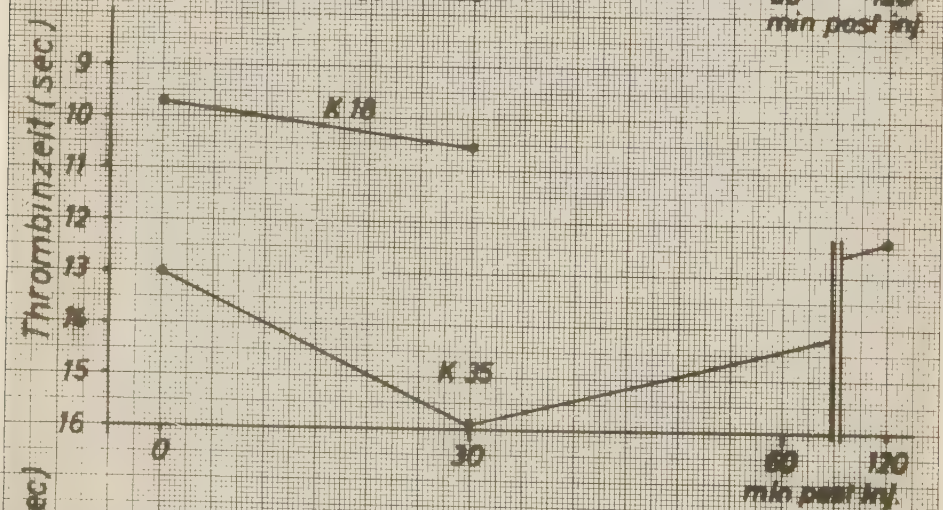
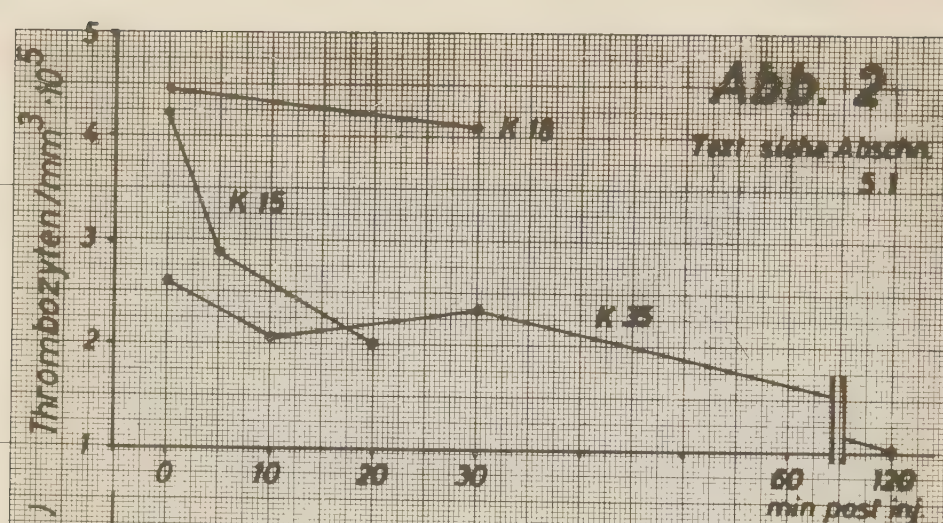
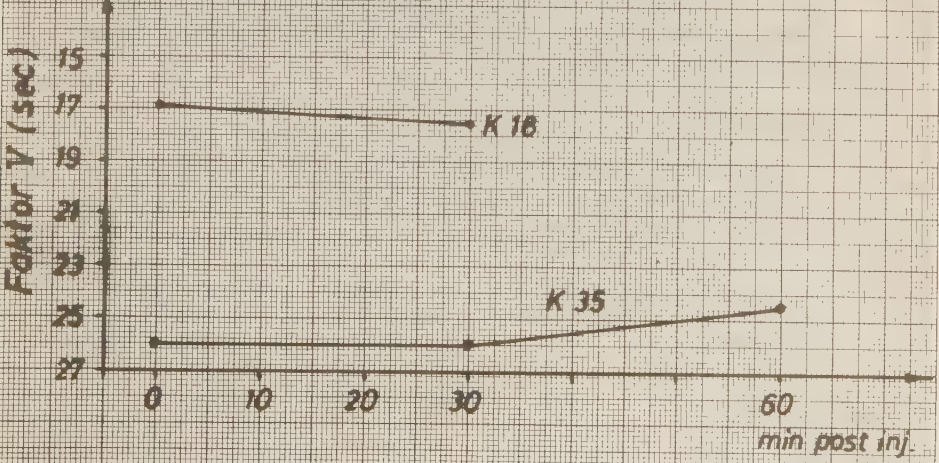
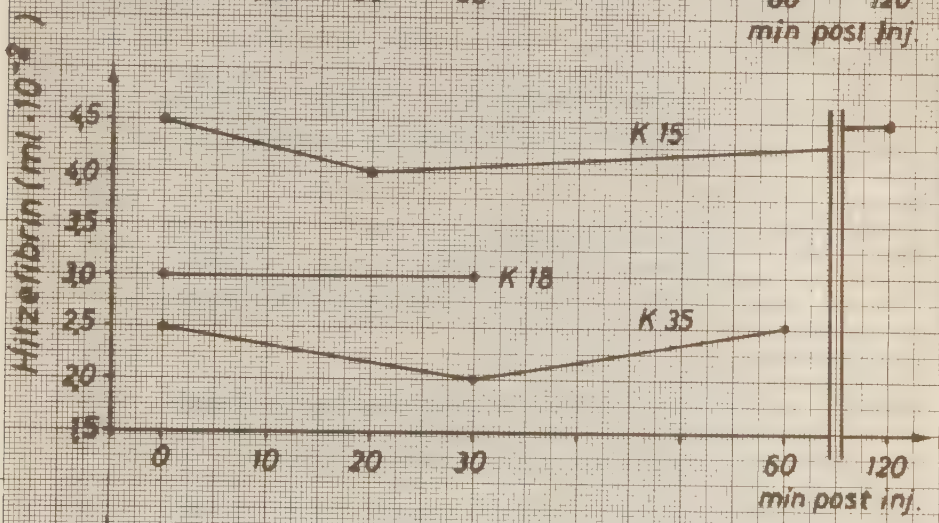
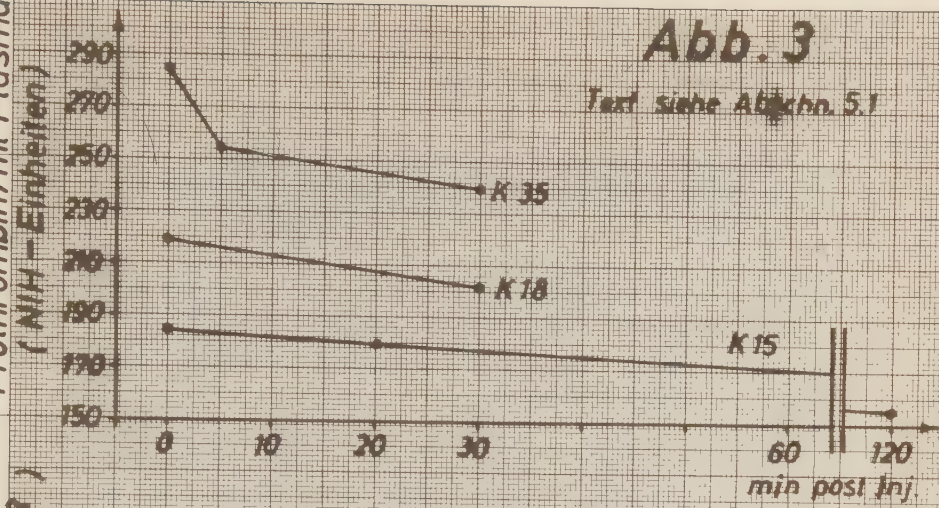


Abb. 3

Text siehe Abbchn. 5.1



In den Abbildungen 2 und 3 sind die Versuchsergebnisse von 3 Kaninchen eingetragen:

Die Thrombozyten (Abb. 2) sind in allen Fällen bei den innerhalb von 2 Std. nach der Hämolytatinjektion gelegenen Messungen deutlich vermindert.

Die Thrombinzeit (Abb. 2) steigt bei den beiden untersuchten Tieren innerhalb von 30' an, eine Messung nach 120' nach Injektion bei einem Kaninchen ergibt jedoch eine sogar etwas unter dem Ausgangswert gelegene Thrombinzeit.

Die Prothrombinzeit (Abb. 2) nach QUICK, modif. n. MARX-BAYERLE steigt in allen Fällen innerhalb der ersten 30' nach der Hämolytatinjektion an.

Bei der Prothrombinbestimmung im Plasma (Abb. 3) (nach Abschn. 1.22) zeigen sich durchwegs abfallende Werte.

Die Werte für das Hitzefibrin (Abb. 3) nach F. H. SCHULZ zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Das gleiche gilt für den Faktor V, (Abb. 3) Faktor VIII und Faktor IX. Auf die graphische Darstellung der Meßwerte der beiden letzten Gerinnungsfaktoren wurde verzichtet.

5.2 Prüfung der intravasalen Blutkoagulabilität nach Injektion von Erythrozyten-Vollhämolysat beim Kaninchen.

Die Herstellung des verwendeten Erythrozyten-Vollhämolysats ist in den Abschnitten 4.11 und 5. bereits beschrieben worden; das Blut dazu war den Kaninchen mindestens 1 Woche vor dem hier beschriebenen Versuch entnommen worden; die Aufbereitung des Hämolysats schloß sich sofort an, seine Stapelung geschah bei -20°C .

Das Prinzip dieses Versuches: Eine große Halsvene des Hasen wurde freigelegt, Hämolysat an anderer Stelle i.V. gespritzt, die dargestellte Vene abgebunden (proximal und distal) und nach einer gewissen Zeit excidiert, um zu prüfen, ob sich in ihr ein Thrombus entwickelt hatte. (Modifiziert nach WESSLER (57) und MARX (29)).

Die Haare im Operationsfeld - dem Hals - konnten durch mehrmaliges Einreiben mit der kosmetischen Enthaarungscreme VEET⁺) restlos entfernt werden. Zur Narkose, die zweckmäßigerweise schon bei Beginn der Enthaarung eingeleitet wurde, fand z.T. das Thiobarbiturat Thiogenal⁺⁺) (30 mg/kg Körpergewicht initial und alle 10 min $1/5$ davon i.V.),

⁺) DAE Health laboratories Ltd., 17 Berners Street, London W 1

⁺⁺) E. MERCK AG, Darmstadt

z.T. Evipan⁺) (30 mg/kg Körpergewicht initial und alle 6 min $\frac{1}{3}$ davon i.V.) Verwendung.

An dem mit Jodtinktur desinfizierten Hals des Kaninchens wurde vorne ein etwa 4 bis 5 cm langer, cranio-caudaler, etwa 2 cm paramedian liegender Hautschnitt angelegt, um anschließend durch vorsichtiges Präparieren die Vena jugularis freizulegen.

Nun wurde die 10 ml Nativblut entsprechende Menge Erythrozyten-Vollhämolysat innerhalb von 30 sec in eine Ohrvene injiziert, um genau 60 sec später die zuvor angelegte proximale Unterbindung der Halsvene zuzuziehen. Etwa 2 $\frac{1}{2}$ cm distal davon wurde sofort anschließend die zweite Unterbindung gelegt.

30 min (In 2 Fällen 20 min) später erfolgte herzwärts der proximalen und herzfjern der distalen Unterbindung nochmals eine solche, um jetzt das abgebundene Venenstück zu excidieren. Es wurde sofort in eine Schale mit physiologischer NaCl-Lösung gelegt und eröffnet, um zu prüfen, ob eine Thrombosierung in dem vom Blutkreislauf ausgeschalteten Gefäß stattgefunden hatte. Die Ergebnisse sind aus Tab. 12 zu ersehen.

⁺) Farbenfabriken BAYER AG, Leverkusen

Die Halswunde des Kaninchens wurde anschließend ordnungsgemäß vernäht. Bis auf 2 überlebten die Tiere die Operation.

Zur Kontrolle fand bei 4 Tieren statt der Injektion von Hämolysat eine solche von NaCl (physiol.)-Lösung (10 ml) Anwendung. Auch bei diesen Tieren waren etwa 1 Woche zuvor 10 ml Blut abgenommen worden.

Tab. 12 Prüfung der intravasalen Blutkoagulabilität nach Injektion von Erythrozyten-Vollhämolysat beim Kaninchen (siehe Abschn. 5.2).

In der Tabelle bedeutet:

Thrombosierungsgrad 0 : Keine Spur einer Thrombosierung

Thrombosierungsgrad I : An den abgebundenen Venenenden maximal glastecknadelkopf-große Thromben

Thrombosierungsgrad II : Venenstück etwa zur Hälfte thrombosiert

Thrombosierungsgrad III: Venenstück praktisch völlig thrombosiert

Versuchstier	Gewicht (kg)	Injektionsflüssigkeit	Venenexcision in min post inj.	Thrombosierungsgrad			
				0	I	II	III
1	5,0	Hämolysat	30			+	
2	5,2	Hämolysat	30				+
3	4,1	Hämolysat	30				+
4	5,1	Hämolysat	30				+
5	4,7	Hämolysat	20				+
6	4,8	Hämolysat	20			+	
7	5,2	phys.NaCl	30	+			
8	4,1	phys.NaCl	30		+		
9	5,2	phys.NaCl	30	+			
10	4,9	phys.NaCl	30		+		

20 bis 30 min nach der HämolySATInjektion ist das vom Blutkreislauf abgebundene Venenstück bei 4 Kaninchen vollständig, bei 2 weiteren zumindest zur Hälfte thrombosiert.

Bei den Kontrolltieren, denen physiol. NaCl-Lösung eingespritzt worden war, zeigt sich bei 2 Tieren keine Spur eines Thrombus, bei 2 weiteren Kaninchen bildeten sich lediglich an den abgebundenen Venenenden max. glastecknadel-kopfgroße Thromben. Es ist anzunehmen, daß diese durch die GewebsthrombokinasE entstehen, die durch die Läsion der Abbindung frei wird.

C. E R G E B N I S S E U N D D I S K U S S I O N

=====

1. Der Prothrombinverbrauchstest und die damit vorgenommenen Oberflächenstudien.

Um die Wirkungen des Erythrozyten-Hämolysats auf den Prothrombinverbrauch zu studieren, wurde nach einer geeigneten Methode zu dessen Bestimmung gesucht; dabei sollte das Prothrombin im Serum und im Plasma unter so weit wie möglich gleichen Bedingungen bestimmt werden (ph-Wert, Temperatur, Reagenzien, Mengen und Konzentrationen).

Um wirklich nur das Prothrombin zu messen, kamen dazu ausschließlich Zwei-Phasen-Tests in Frage. Die Serum-Prothrombinbestimmung nach SOULIER (51) und die Plasma-Prothrombin-Messung nach RIEBEN-SCHULTZE (44, 46), modif. MARX (29), beides bewährte Methoden, wurden deshalb so weit modifiziert, daß sie diesen Forderungen entsprachen (Kap. B, Abschn. 1 und Tab. 1).

Um die mit dieser Methode gewonnenen Werte (in sec) in absolute Angaben umzusetzen, wurde wiederum unter so weit wie möglich gleichen Versuchsbedingungen eine Thrombin-Fibrinogen-Eichkurve aufgestellt. Da diese sich nicht bei jeder Fibrinogen-Charge identisch zeigte, war für jede dieser Chargen eine eigene Eichkurve

nötig (Abb. 1 als Beispiel). Damit war es möglich, die gefundenen Plasma- und Serum-Prothrombinwerte in NIH-Einh. Thrombin anzugeben (Abschn. 2). Die Normalwerte dieser Bestimmungen und der daraus errechnete Prothrombin-Rest (in %) sind in Tab. 3 vermerkt.

Weiter wurden bei 6 Versuchspersonen, die selbst und/oder deren Blutsverwandte an Gerinnungsstörungen litten, die Plasma- und Serum-Prothrombinspiegel gemessen, um damit ebenfalls den Prothrombinrest zu errechnen (Tab. 4). Wie erwartet zeigten die ausgeprägten Fälle von Hämophilie A (75 min nach der Bildung eines soliden Gerinnsels) einen Prothrombin-Rest, der weit über 50 % lag. Bei einem Fall einer schweren Thrombopenie (6.000 Thrombozyten/mm³) fand sich ein Prothrombin-Rest, der mit 9,2 % etwa um das dreifache über dem höchsten Normalwert lag, während bei einer leichteren Form dieser Erkrankung (30.000 Thrombozyten/mm³) mit 4,3 % gerade die obere Grenze der Normalwerte überschritten wurde. Interessant war, daß bei einer sicheren Hämophilie-A-Anlageträgerin (2 Söhne leiden unter dieser Krankheit) der Prothrombinrest mehr als das doppelte des höchsten Normalwerts betrug.

Um für die späteren Studien der Hämolysatwirkungen in vitro einigermaßen Intima-ähnliche Kontakt-Bedingungen herzustellen, wurden in Kap. B, Abschn. 3 verschie-

dene Reagenz-"Glas"-Oberflächen geprüft.^{+))}

(Eine umfassende Darstellung der Oberflächenprobleme bei der Gerinnung mit umfangreichen Literaturangaben findet sich in der Monographie von WAALER (52)).

Als Indikator bei diesen Prüfungen diene der Prothrombinverbrauch, ein Verfahren, das u.a. auch PENNER (37) und DICK et al. (9) (hier nach der Prothrombin-Bestimmungsmethode nach WARE und SEEGER (56)) verwenden.

Die als am besten befundene Silikonierung ergab mit der hier verwendeten Methode 75 min nach der Bildung eines soliden Gerinnsels einen Prothrombinrest von 17 - 33 % bei verschiedenen "gesunden" Versuchspersonen, während Mehrfachbestimmungen mit dem Blut einer Person eine Schwankungsbreite von etwa $\pm 1,5$ % Rest-Prothrombin zeigten.

Die absoluten Zahlenangaben für den Prothrombinrest lassen sich natürlich nur innerhalb einer Methode der Prothrombin-Konsumptions-Messung vergleichen. Ihre Gegenüberstellung zu Angaben der Literatur wäre deshalb mehr oder weniger sinnlos. Viel eher vergleichen lassen sich

- 1) die Schwankungsbreite im mehrfachen Parallelversuch bei einer Testperson. Diese Angabe ist

^{+))} Herrn Dr. Eder von der Fa. Wacker-Chemie, München, sei an dieser Stelle für seine Ratschläge bei der Auswahl der Silikonierungs-Methoden herzlich gedankt.

ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Silikonierungsqualität. Bei der in Kap. B, Abschn. 3.13 beschriebenen Methode beträgt dieser Wert - 75 min nach der Gerinnung - $\pm 1,5$ % Rest-Prothrombin (gültig für Werte zwischen 17 - 33 %).

- 2) der Abstand der Prothrombin-Rest-Werte im Glas von denen in Silikon. Er ist ein Maßstab für die (hier erwünschte) niedrige Oberflächen-Kontakt-Aktivierung bei der Gerinnung und beträgt hier - 75 min nach der Gerinnung - minimal 15 % Restprothrombin (beim Gesunden).

Die eben unter 1) und 2) beschriebenen Eigenschaften sind, getrennt genommen, besser oder gleich, zusammen betrachtet, besser als die mir bekannten Werte in der Literatur. Exakte Vergleiche sind jedoch auch hier nicht möglich.

Eines darf nun nicht übersehen werden. So optimal die oben beschriebene Silikonierung auch ist, von Endothelbedingungen kann bei einem minimalen Prothrombinverbrauch von 67 % in den ersten 75 min noch nicht die Rede sein.

Der Prothrombin-Rest in hydrophoben Kunststoffröhrchen (Hostalen^R, Polyakrylsäure) lag durchwegs tiefer als in den silikonierten Gläsern. (Tab. 6). Dasselbe

gilt für die geprüften Kunststoffschläuche (Tab. 7), die z.T. als Gefäßersatz (Teflon), z.T. in Geräten zur extracorporalen Blutleitung verwendet werden. Mit der oben beschriebenen Methode zeigt der Silikon-Kautschuk trotz seines Silikongehaltes einen fast glasgleichen Prothrombin- Verbrauch.

2. Versuche mit Erythrozytenhämolysat.

Daß Hämolyse die Blutgerinnung fördert, war schon gegen Ende des letzten Jahrhunderts bekannt. So berichten NAUNYN 1873 (33) und LANDOIS 1875 (26) über diese Erscheinung. Auch WOOLDRIDGE (60) und später BARRAT und YORKE (3) zeigten, daß das Erythrozytenstroma gerinnungsfördernd wirkt.

Die heftig verteidigte Auffassung, daß den Thrombozyten als einzigem zelligen Blutbestandteil eine Rolle bei der Blutgerinnung zukommt, hat eine weitere objektive Untersuchung dieses Problems verhindert; so gerieten diese Erkenntnisse in Vergessenheit.

Erst seit etwa 15 Jahren wurde dieses Thema von verschiedenen Forschern erneut aufgegriffen (FULLERTON et al. (16), SHINOWARA (50), GOLLUB (19), QUICK et al. (39), LEUPOLD (27), KÜNZER (25), GEORGATSOS et al.(18)).

SHINOWARA (50) und GOLLUB (19) beobachteten, daß in den Erythrozyten und in anderen Blutzellen Faktoren ent-

halten sind, die die Blutgerinnung beeinflussen. Von ihnen wurde diese Erscheinung als eine "natürliche Gerinnungsförderung" gedeutet.

QUICK et al. (39) und GEORGATSOS et al. (18) berichteten, daß die Erythrozyten einen Gerinnungsfaktor, ähnlich dem der Thrombozyten, enthalten, der sich jedoch von dem letzteren dadurch unterscheidet, daß er nicht nur stärker ist, sondern auch Wirkungen hat, die den Thrombozyten fehlen.

Kurz darauf isolierten HUSSEY und KASER (22) diesen Faktor, genannt "Erythrozytin", aus den roten Blutkörperchen. Ihren Untersuchungen nach scheint er ein Phospholipid zu sein.

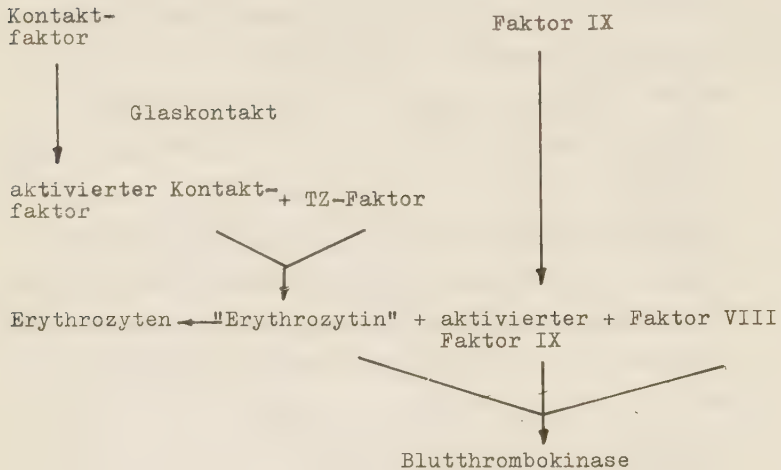
Einige Jahre später berichtete QUICK (41), daß Hämolysat in Silikon und in Glas sowohl bei thrombozytenreichem als auch bei thrombozytenarmem Plasma und bei Vollblut die Prothrombin-Verbrauchszeit in etwa gleichem Maße beträchtlich verlängert. Daraus geht hervor, daß unter diesen Versuchsbedingungen die Wirkung des Hämolysats von der Thrombozytenzahl unabhängig ist.

QUICK (41) vermutet, daß das "Erythrozytin" mit dem Produkt der Wechselwirkung von Thrombozyten (bzw. Thrombozytenfaktor 3) und aktiviertem Kontaktfak. identisch ist, das ja zu seiner Wirkung des Glaskontaktes nicht mehr bedarf.

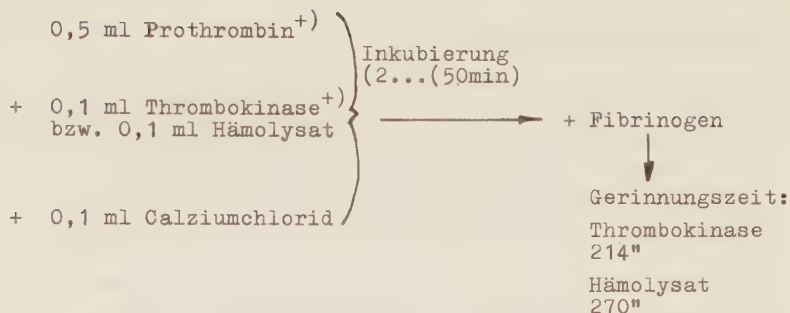
Das Verhältnis des "Erythrozytins" zum Gerinnungsmechanismus wird durch die Beobachtung des gleichen Autors (41) weiter erhellt, daß der Prothrombin-Verbrauch - ebenfalls mit der Prothrombin-Verbrauchszeit gemessen - im Glas bei Mischung des Vollbluts mit seinem eigenen thrombozytenarmen Plasma geringer ist als der des Vollbluts alleine oder der der Mischung von TZ-reichem mit TZ-armem Plasma. QUICK schließt daraus, daß die Erythrozyten für das Absinken des Prothrombin-Verbrauchs verantwortlich sind und hält es für wahrscheinlich, daß die roten Blutkörperchen das Reaktionsprodukt von aktiviertem Kontaktfaktor und Thrombozyten aufnehmen. Wie QUICK an derselben Stelle (41) zugibt, besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß die Erythrozyten ein frühes Gerinnungsstadium bei diesem Versuch hemmen.

Ein provisorisches Schema dieser theoretischen Vorgänge ist in Abb. 4 wiedergegeben (aus QUICK (41)).

Abb. 4 Das Verhältnis der Thrombozyten zu dem Gerinnungs-
faktor der Erythrozyten ("Erythrozytin") bei der
Produktion von Blutthrombokinase. (Aus QUICK (41),
leicht modifiziert)



KÜNZER (25) stellte u.a. folgende Wirkungen des Hämolysats auf die Blutgerinnung fest: Die Recalzifizierungszeit steigt bei Verwendung eines 3 Wochen bei -20°C gelagerten Hämolysats gegenüber der eines frischen deutlich an. Weiterhin beobachtete der Autor, daß das Hämolysat die Thrombokinase in folgendem Ansatz weitgehend ersetzen kann:



KÜNZER (25) fand ferner, daß der im Hämolysat enthaltene Gerinnungsfaktor weder an Aluminiumhydroxyd adsorbierbar, noch dialysabel oder ätherlöslich ist. Nach der Ätherbehandlung steigt die Aktivität des Hämolysats an, was sich der Autor mit der Herauslösung eines Hemmfaktors erklärt.

DESMET, VERSTRAETE und VANDENBROUKE (8) konnten weitere Beobachtungen zu diesem Thema beitragen. Sie bewiesen, daß die Aktivität des Hämolysats nicht durch Verunreinigung mit Thrombozyten erklärt werden kann. Die Recalzifizierungszeit bei Zusatz von Hämolysat, das 2.000 bis 5.000 Thrombozyten/mm³ enthielt, war nämlich kürzer als die bei Zusatz einer Plättchensuspension, in der 800.000 Thrombozyten/mm³ konzentriert waren. Weiter geht aus ihren Versuchen hervor, daß das Hämolysat weder Thrombin noch Prothrombin oder die Faktoren

⁺) Präparate: DEUTSCHE HOFFMANN-LA ROCHE

VII, VIII und IX enthält.

Diese Autoren halten die Aktivität des Hämolysats für weitgehend identisch mit dem Thrombozytenfaktor 3.

WALTHER (54) berichtet, daß Hämolysat konzentrationsabhängig im Prothrombinkonsumptionstest nach QUICK den Prothrombinverbrauch sowohl beim Gesunden als auch bei Patienten mit Thrombozytopenien stark erhöht, ein Effekt, der im Vollblut des Hämophilie-A-Patienten, in allerdings sehr viel geringerem Maße, auch auftritt (siehe Tab. 13, aus WALTHER (54)). Der Autor hält den hier wirksamen Erythrozytenfaktor für ähnlich oder gleich dem Thrombozytenfaktor 3.

In der gleichen Arbeit konnte WALTHER auch zeigen, daß Hämolysat, besonders in mittleren Verdünnungen, im Thrombokinese-Bildungstest etwa die gleichen Gerinnungszeiten ergibt, wie Thrombozyten. Die Aktivierungszeiten sind allerdings - auch bei zusätzlicher Verwendung von Thrombozyten- verlängert. Unverdünntes Hämolysat verkürzt in diesem Test die Gerinnungszeiten nicht; diese Erscheinung führt WALTHER auf einen in den Erythrozyten enthaltenen Hemmfaktor der Thrombokinese-Bildung zurück, der in den höheren Verdünnungen des Hämolysats unwirksam wird.

Außerdem fand WALTHER (54), daß hämolysierte Erythrozyten einen Heparininhibitor, der dem Thrombozyten-

faktor 4 entspricht, aufweisen und zusätzlich indirekte Wirkungen auf die Thrombozyten ausüben. Dieser letztere Schluß wird aus dem Befund gezogen, daß die maximale Elastizität im Thrombelastogramm in Abhängigkeit von der anwesenden Thrombozyten-Konzentration erhöht wird.

LEUPOLD (27) berichtet ebenfalls von einer hohen Aktivität des Hämolysats - besonders der mittleren Verdünnungen - im Thrombokinase-Bildungstest nach BIGGS, MC FARLANE modif.DUCKERT et al. (10), ein Effekt, den, in milderer Form, auch ein Alkohol-Äther-Extrakt des Hämolysats zeigt. Chloroform-Extrakte waren weit weniger aktiv.

Tab. 13 Prothrombinrest (in %) 1 Std. nach der Gerinnung, gemessen mit dem Prothrombin-Konsumptionstest nach QUICK. (Aus WALTHER (54))

	Hämolysat			
	0	1 : 100	1 : 10	1
Vollblut, gesund	24	11	1	1
Vollblut, Thrombopenie	76	14	1	1
Vollblut, Hämophilie A	91	88	73	70

WALTHER (55) stellte nun auch in-vivo-Versuche beim Kaninchen an. Die Tiere erhielten in eine Vene des rechten Ohres Gefrierhämolysat injiziert, das aus thrombozytenfreien und leukozytenarmen Suspensionen gewaschener Kaninchen-Erythrozyten hergestellt worden war. Für die Gerinnungsuntersuchungen wurde vor der Injektion Blut aus der freigelegten rechten Jugularvene entnommen, während und nach der Injektion aus der linken. Diese Versuche führten zu den zwei Feststellungen, daß hämolysierte Erythrozyten auch in vivo erhebliche Gerinnungswirkungen haben und daß diese nicht nur von der injizierten Hämolysatmenge, sondern auch von der Injektionsgeschwindigkeit abhängen. Bei der Einspritzung von 2,5 ml Hämolysat/kg Körpergewicht (5 ml/min) starben von 6 Versuchstieren 5 sofort nach der Injektion. Die Sektion zeigte im stark dilatierten rechten Ventrikel und im rechten Vorhof ausgedehnte wandständige Thromben. Bei der Injektionsgeschwindigkeit von 1 ml/min wurden "wesentlich größere Mengen" vertragen, jedoch trat bald eine schwere Gerinnungsstörung auf:

Im Thrombelastogramm zeigte sich eine starke Verlängerung der Reaktions- und Thrombusbildungszeiten, wobei gleichzeitig die Elastizitätswerte abfielen. Auch die Prothrombinzeiten nach QUICK wurden stark

verlängert, während die Thrombozytenzahlen und die Fibrinogenspiegel langsamer absanken.

Diese Ergebnisse erinnern an die von Gewebsthrombokinase-Injektionen: Hier führt eine hohe Injektionsgeschwindigkeit ebenfalls zum Tod der Versuchstiere mit Thrombosierung des rechten Ventrikels (DYCKERHOFF et al. (11)), während bei langsamer Einspritzung Fibrinabscheidungen in den Kapillargebieten und ein schwerer Gerinnungsdefekt entstehen (FRIESEN et al. (15), HARDAWAY et al. (21)).

Bei den experimentellen Untersuchungen am Menschen mußte man sich natürlich auf relativ viel kleinere Hämolysatinjektionen beschränken. WALTHER (55) injizierte ein Hämolysat, das aus 5 ml Eigenblut und 15 ml aqua dest. hergestellt wurde. Auch hier fanden sich eine statistisch gesicherte Verkürzung der Thrombusbildungszeit im Thrombelastogramm und außerdem eine Aktivitätszunahme der Faktoren V und VII.

EGEBERG (13) findet bei 3 Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie und bei 2 Patienten mit kongenitaler sphärozytärer hämolytischer Anämie eine Tendenz zu kurzen Kephalinzeiten nach EGBERG (12) und hohen Faktor-VIII-Spiegeln.

In weiteren Studien injizierte er gesunden Versuchspersonen 30 ml (10 bzw. 20 ml ergaben keinen meß-

baren Effekt) Hämolysat ihres eigenen Blutes. Dabei trat ein vorübergehender Anstieg der Faktoren V, VIII und des Fibrinogens mit einem Maximum am 2. Tag nach der Injektion auf. Der Autor deutet diese Ergebnisse als mögliche Stimulierung der Bildung dieser Faktoren.

In den in Kap. B, Abschn. 4 beschriebenen eigenen Versuchen wurde die Wirkung der Bestandteile des Erythrozytenhämolysats auf den Prothrombinverbrauch studiert. Es konnte gezeigt werden, daß durch Zusatz von 4 Vol-% der nach Abzentrifugierung des Stomas verbleibenden Flüssigkeit (= "Rest"-Hämolysat) zum Nativblut der Prothrombinrest stark vermindert wird: 120 min nach der Bildung eines soliden Gerinnsels betrug er im Silikonglas weniger als 0,5 % (Parallelversuch mit NaCl 9,7 %).

Dieser Wert liegt sogar unter dem des Leerversuches in Glas (1,8 %). (Tab. 8).

Der Zusatz von 1 Vol-% "Rest"-Hämolysat bewirkt auch noch eine starke Herabsetzung des Prothrombinrestes in Silikon ("Antisilikoneffekt"), erreicht jedoch nicht mehr die Werte im Glas (Tab. 9 + 10).

Parallel dazu wurde unter gleichen Bedingungen die Wirkung des Erythrozytenstomas auf den Prothrombinverbrauch geprüft. Die Zugabe von 20 Vol-% (bezogen auf das ursprüngliche Blutvolumen, aus dem das Stroma ge-

wonnen wurde) zum Nativblut ließ ebenfalls den Prothrombinverbrauch ansteigen; die gemessenen Werte lagen in der gleichen Größenordnung wie die bei Verwendung von 1 Vol-% "Rest"-Hämolysat.

Die zum Vergleich durchgeführten Untersuchungen mit Chloroformhirnextrakt und Tachostyptan^R ergaben, jedenfalls in der verwendeten Verdünnung (1 : 100 jeweils), keine meßbare Erhöhung des Prothrombinverbrauches im Silikonglas. (Tab. 11).

Es wurden nun auch die Wirkungen des Erythrozyten-Vollhämolysats auf die Blutgerinnung in vivo am Kaninchen studiert (Kap. B, Abschn. 5.):

Vor und in verschiedenen Zeitabständen (bis max. 120 min) nach der Injektion von der 10 ml Nativblut entsprechenden Menge Eigen-Vollhämolysat wurde den Tieren Blut aus einer Vene des jeweils kontralateralen Ohres abgenommen, um den Spiegel einiger Gerinnungsfaktoren zu messen. Die Körpergewichte der Tiere lagen alle zwischen 4,8 und 5,2 kg, so daß ca. 2 ml Hämolysat/kg Körpergewicht injiziert wurden. (Injekt.-Geschwindigkeit : 5 ml/min).

Nach der Hämolysat-Einspritzung ergab sich (Abb. 2 und 3) ein deutliches Absinken der Thrombozyten (noch nach 120 min), die Thrombinzeiten stiegen etwas

an (bis 30 min post inj.), ebenso die Prothrombinzeiten. Der Prothrombinspiegel fiel deutlich ab.

Die Veränderungen des Fibrinogenspiegels konnten mit der Hitzefibrin-Methode nach F. H. SCHULZ (48) nicht erfaßt werden; die in einem Falle durchgeführte Fibrinogen-Zeit nach CLAUSS (6) war zum Zeitpunkt der Messung angestiegen.

Die Plasmaspiegel von Faktor V, VIII und IX änderten sich nicht signifikant.

In weiteren Versuchen (Kap. B, Abschn. 5.2.) in vivo am Kaninchen wurde Eigen-Vollhämolysat in der gleichen Menge wie in den vorigen Versuchen in eine Ohrvene injiziert. Die vorher freigelegte kontralaterale Vene jugularis wurde auf eine Länge von etwa 2,5 cm durch Abbinden vom Blutkreislauf ausgeschaltet und nach 20 bzw. 30 min excidiert (modif. nach MARX (29) und WESSLER (57/58)). Es zeigte sich in allen Fällen eine starke Thrombusbildung, während das Blut im Parallelversuch bei NaCl-Injektion jedes Mal noch praktisch ungeronnen geblieben war. (Tab. 11).

Diese Ergebnisse zeigen, daß etwa innerhalb der ersten 30 min nach der Hämolysat-Injektion im Gefäßsystem der Kaninchen nicht unerhebliche Gerinnungsvorgänge ablaufen. Um diese zu aktivieren, ist offenbar

kein Kontakt des Blutes mit glasähnlichen Oberflächen nötig, es sei denn, das Erythrozytenstroma böte diese Oberfläche.

Die andere Möglichkeit dieser Aktivierung ist das von QUICK (41) diskutierte direkte Eingreifen des Hämolysat-Gerinnungsfaktors (Abb. 4).

Einem alleinigen oder auch nur überwiegenden Oberflächeneffekt des Erythrozytenstromas widerspricht in den vorliegenden Versuchen der hohe Prothrombinverbrauch in vitro bei Zusatz von stromaarmem "Rest"-hämolysat; die Aktivität dieses Erythrozytenbestands teils fordert auch, daß der gerinnungsfördernde Hämolysatfaktor zumindest zum Teil in den nicht-geformten Bestandteilen der roten Blutkörperchen enthalten ist.

Nach Würdigung der Literatur und nach den eigenen Versuchsergebnissen kann es als erwiesen gelten, daß hämolysierte Erythrozyten sowohl in vitro als auch in vivo eine starke Gerinnungsaktivität besitzen, die intravasal zu Thrombenbildung mit nachfolgender Blutungsneigung führen.

Die Bedeutung dieser Erscheinung für die Folgen jeglichen Auftretens einer Hämolyse intra vitam liegt auf der Hand.

Endgültiges über die Art und Wirkungsweise des

Erythrozyten-Faktors läßt sich jedoch noch nicht sagen. Die Einzelbefunde sind vielgestaltig. Einerseits sprechen sie für eine Identität des "Erythrozytins" mit dem Thrombozytenfaktor 3 (DESMET et al., WALTHER, s.o.), anderenteils lassen QUICK's Versuche auf eine darüber hinaus reichende Wirkung des Hämolysatfaktors schließen, einer Vermutung, der sich auch der Verfasser auf Grund der eigenen Versuche anschließen möchte.

Noch weniger geklärt ist die Frage nach der physiologischen Bedeutung - so überhaupt eine existiert - des in den Erythrozyten enthaltenen Gerinnungsfaktors.

QUICK (41) vermutet, daß bei einer Überproduktion dieses "Erythrozytins", das seiner Meinung nach im Plasma gebildet wird (Abb. 4), die Erythrozyten es sozusagen durch Absorption unschädlich machen. Diese teleologische Vorstellung ist so interessant wie mehr oder weniger hypothetisch (s.o.).

Andere Theorien wurden bisher, soviel mir bekannt ist, nicht geäußert. Solange noch keine weiteren entscheidenden Tatsachen zu diesem Thema gefunden werden, erscheint es auch müßig, Hypothesen aufzustellen.

D. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Ausgehend von bewährten Methoden der Plasma- bzw. Serum-Prothrombinbestimmung wurde eine Zwei-Stufen-Methode zur Messung des Prothrombinverbrauchs in NIH-Thrombin-Einheiten ausgearbeitet und mit dieser die Gerinnungsaktivität verschiedener Oberflächen studiert.

An Hand dieser Untersuchungen konnte eine optimale Silikonierungsmethode gefunden, sowie einige Kunststoffoberflächen auf ihre relative Endothelähnlichkeit geprüft werden.

- 2) Weiter wurde gezeigt, daß sowohl das Erythrozyten-Stroma als auch die bei hochtouriger Zentrifugierung von Hämolysat überstehende Flüssigkeit den Prothrombinverbrauch des Vollbluts in Silikon so stark erhöht, daß der Glaskontakt bei der Gerinnungsaktivierung völlig ersetzt wird (Antisilikoneffekt).
- 3) Eine Einspritzung von Eigen-Erythrozyten-Hämolysat beim Kaninchen ergab Veränderungen verschiedener Blutgerinnungsfaktoren, die für eine kurz nach der Injektion ablaufende geringgradige intravasale Gerinnung sprechen.

- 4) Hämolysatinjektionen beim Kaninchen ergaben in einer in situ durch Abbinden ausgeschalteten Vene (kompletter Stasistest (WESSLER-Test)) eine Thrombosierung dieses Gefäßes, während im Leerversuch das stagnierte Blut nach der gleichen Zeit in jedem Falle flüssig blieb. Dieser Befund beweist einen deutlichen Thrombophilierungseffekt beim Auftreten von Hämolysat im Blut bei praktisch intaktem Endothel.

E. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- (1) ABRAMSON, M. Hemolytic transfusion reaction with death. Lancet 55, 805 (1935)
- (2) ASTOWE, P.S. Hemolysis following transfusion. J.A.M.A. 79, 1511 (1922)
- (3) BARRAT, J.O.W., and YORKE, W. Brit. Med. J. 1, 235 (1914)(zitiert n.(41))
- (4) BAYERLE, H., MARX, R. Über ein Zwei-Stufen-Verfahren zur Bestimmung von Prothrombin in Blut und Plasma. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chemie 283, 248 (1949)
- (5) BORDET, J., and GENGOU, O. Recherches sur la coagulation de sang et les sérums anti-coagulants. Ann. Inst. Pasteur, 15, 129 (1901)
- (6) CLAUSS, A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. acta haemat. 17, 237 (1957)
- (7) DERLATH, S. Die direkte phasenoptische Thrombozyten und Retikulozytenzählung. Ärztliche Forschung 10, 552 (1956)
- (8) DESMET, V., VERSTRAETE, M., et VANDENBROUCKE, J. Propriétés coagulantes d'hémolysats erythrocytaires. Thromb. Diath. haem. 1, 459 (1957)
- (9) DICK, F.W., JACKSON, D.P., CONLEY, C.L. Surface as a quantitative factor in prothrombin utilization. J. clin. invest. 33, 1423 (1954)

- (10) DUCKERT, F.,
FLÜCKINGER, P.,
ISENSCHMID, H.,
MATTER, M.,
VOGEL-MENG, J.,
KOLLER, F. A modification of the throm-
boplastin generation test.
Acta haemat.
12, 197 (1954)
- (11) DYCKERHOFF, H.
LOEVENICH, K. Über die Aufhebung der toxi-
schen Wirkung von Muskel-
säften durch Verminderung
der Gerinnungsfähigkeit des
Blutes.
Zschr. exper. Med.
106, 98 (1939)
- (12) EGEBERG, O. Assay of antihemophilic A, B
and C factors by one-stage
cephalin system.
Scand. J. clin. Lab. Invest.
13, 140 (1961)
- (13) EGEBERG, O. Blood coagulation and intra-
vascular hemolysis.
Scand. J. clin. Lab. Invest.
14.3, 217 (1962)
- (14) ELLENHORN, M.J.
FEIGENBAUM, L.Z.
PLUMHOF, C.
METTIER, S.R. Paroxysmal nocturnal hemo-
globinuria with chronic he-
molytic anemia. Report of
a case with postmortem obser-
vations.
Arch. intern. Med.
87, 868
- (15) FRIESEN, S.R.,
HARSHA, W.N.,
MC CROSCY, C.H. Massive generalized wound
bleeding during operation
with clinical and experimental
evidence of blood transfusion
reactions.
Surgery, S. Louis
32, 620 (1952)
- (16) FULLERTON, H.W.,
ANASTASOPOULOS, G. Anticoagulant therapy
Brit. med. J.
11, 1492 (1949)
- (17) GEIGER, M.,
DUCKERT, F.,
KOLLER, F. Quantitative Bestimmung von
Faktor VIII und Faktor IX
bei Blutsippen.
V. Kongr. Europ. Gesellsch.
Hämatologie
S 413, Springer-Verlag, Berlin
(1956)

- (18) GEORGATSOS, J.G.,
HUSSEY, C.V.,
QUICK, A.J. Nature and action of a new
clotting factor obtained
from erythrocytes.
Am. J. Physiol.
181, 30 (1955)
- (19) GOLLUB, S. Thromboplastic potency of
whole blood components.
Fed. Proc.
12, 54 (1953)
- (20) HAM, G.G.,
HORACK, H.M. Chronic hemolytic anemia with
paroxysmal nocturnal hemo-
globinemia.
Report of case with only occa-
sional hemoglobinuria and
with complete autopsy.
Arch. int. Med.
67, 735
- (21) HARDAWAY, R.M.,
MC KAY, D.,
WILLIAMS, J.H. Lower nephron nephrosis
(ischemic nephrosis) with
special reference to hemorrha-
gic diathesis following in-
compatible blood transfusion
reaction.
Amer. J. Surg.
87, 41 (1954)
- (22) HUSSEY, C.V.,
KASER, M.M. Erythrocytin, a clotting
factor from erythrocytes,
its action and purification.
Fed. Proc.,
15, 279 (1955)
- (23) JAKES, FIDLAR,
FELDESTED,
MACDONALD Silicoes and blood coagula-
tion.
Canad. med. Ass. J.,
55, 26 (1946)
- (24) JÜRGENS, R.,
STUDER, A. Helvet. physiol. Pharm. acta
6, C 24 (1948)(Zitiert n. (55))
- (25) KÜNZER, W. Zur Gerinnungsaktivität des
Nabelschnurerythrozytenhämo-
ly-
sats.
V. Kongr. Europ. Gesellsch.
Hämatol.,
S 619, Springer-Verlag, Berlin,
1956.

- (26) LANDOIS, L. Die Transfusion des Blutes.
F.C.W. Vogel, Leipzig 1875
- (27) LEUPOLD, R. Zur thromboplastischen Wirkung der Erythrozyten.
Schweiz. med. Wschr.
85, 911 (1955)
- (28) LEVINE, E.C.
SEGALL, H.N. Post-transfusions reactions;
alterations in blood after
ether anaesthesia and after
blood transfusion.
Surg. Gynec. Obstet.
35, 313 - 319 (1922)
- (29) MARX, R. Hämostaseologie. Habilitationsschrift München 1953
- (30) MARX, R. Zur Pathogenese von Thrombosen.
Fortschr. Med.,
82, 708 (1964)
- (31) MC KELLAR, M.
DACIE, J.V. Thromboplastic activity of
the plasma in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.
Brit. J. Haemat.
4, 404 (1958)
- (32) MUIRHEAD, E.E. Incompatible blood transfusions with emphasis on acute renal failure.
Surg. Gynec. Obstet.
92, 734 - 746 (1951)
- (33) NAUNYN, B. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.
exper. Path.
1, 1 (1873)
(Zitiert nach (55))
- (34) NEUDA, P.M. Die "spontane" Thrombose.
Med. Klin. 1810 (1962)
- (35) PARR, L.W.,
KRISCHNER, H. Hemolytic transfusion fatality with donor and recipient in the same blood group.
J.A.M.A.
98, 47 (1932)
- (36) PATTON, T.B.,
WARE, A.G.,
SEEGERS, W.H. Clotting of plasma and silicone surfaces.
Blood 3, 656 (1948)

- (37) PENNER, J.A. Prothrombin Levels in Serum.
Thromb. Diath. haem.
10, 332 (1964)
- (38) PERKINS, H.A.,
BOULWARE, J.M.,
FEICHTMEIR, T.V.,
THAYER, W.W.,
SPAET, T.H. Paroxysmal nocturnal hemo-
globinuria; report of four
cases, with observations on
treatment with 3,3'-mythyle-
nebis (4-hydroxycoumarin)
(Dicumarol)
Ann. intern. Med.
43, 1218 (1955)
- (39) QUICK, A.J.,
GEORGATSOS, J.G.,
HUSSEY, C.V. The clotting aktivty of human
erythrocytes: theoretical and
clinical implic.
Am. J. Med. Sci.
228, 207 (1954)
- (40) QUICK, A.J. Hemorrhagic Diseases,
Lea & Febiger, Philadelphia
1957
- (41) QUICK, A.J. Influence of erythrocytes on
the coagulation of blood.
Am. J. Med. Sci.
239, 101 (1960)
- (42) QUICK, A.J. Platelets, Erythrocytin and
tissue thromboplastin.
Thromb. Diathes. haem.,
7, 156 (1962)
- (43) RATNER, B. Allergy, Anaphylaxis and
Immunotherapy,
Basic Principles and Practi-
ces; ...
Williams & Wilkins, Baltimore
1943
- (44) RIEBEN, W.K. Beiträge zur Erkenntnis der
Blutgerinnung
Basel, Benno Schwabe & Co.
1947
- (45) SCHNEIDER, C.L. Obstetr. a. Gynec.
4, 273 (1954)
(Zitiert nach (55))

- (46) SCHULTZE, H.W. Theoretische und experimentelle Grundlagen der Prothrombinbestimmung unter Berücksichtigung des Prothrombinaccelerators. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Pat. Pharm. 207, 173 (1949)
- (47) SCHULTZE, H.W., SCHWICK, G. Laboratoriumsblätter des Serumvertriebs Marburg GmbH, Marburg a.d. Lahn
- (48) SCHULZ, F.H. Klinische Erfahrungen mit der Hitzefibrinbestimmung. Dtsch. Gesdws. 12, 566 (1957)
- (49) SCOTT, R.B., ROBB-SMITH, A.H.T., SCOWEN, E.F. The Marchiafava-Micheli syndrome of nocturnal haemoglobinuria with haemolytic anaemia. Quart. J. Med. ns 7, 95 (1938)
- (50) SHINOWARA, G.Y. Enzyme studies on human blood XI. The isolation and characterization of thromboplastic cell and plasma components. J. Lab. clin. Med. 38, 11 (1951)
- (51) SOULIER, J.P. La consommation de la prothrombine pendant la coagulation du sang veineux et du sang capillaire, nouvelle méthode d'investigation des syndromes hémorragiques (étude de 57 cas.). Rev. d' Hémat. 2, 302 (1948)
- (52) WAALER, B.A. Contact Activation in the Intrinsic Blood Clotting System. Oslo University Press, Oslo 1959

- (53) WAHLE, G.H., JR.,
MUIRHEAD, E.E. Bilateral renal cortical
necrosis in a child associa-
ted with an incompatible
blood transfusion.
Texas J. Med.
49, 770 (1953)
- (54) WALTHER, G. Über die Gerinnungsaktivität
hämolysierter menschlicher
Erythrozyten.
Blut 2, 211 (1956)
- (55) WALTHER, G. Über Gerinnungswirkungen der
Hämolyse;
Vortrag auf dem Deutschen
Kongreß für Bluttransfusion,
Köln 1957
- (56) WARE, A.G.,
SEEGERS, W.H. Two-Stage Procedure for the
Quantitative Determination
of Prothrombin Concentration.
Amer. J. clin. Path.
19, 471 (1949)
- (57) WESSLER, S. Studies in intravascular
coagulation. I. Coagulation
changes in isolated venous
segments.
J. Clin. Invest.
31, 1011 (1952)
- (58) WESSLER, S. Studies in intravascular
coagulation. III. The patho-
genesis of serum-induced
venous thrombosis.
J. appl. Physiol.
14, 943 (1959)
- (59) WIENER, A.S. Blood Groups and Transfusion.
3rd ed. Springfield, Ill.,
Thomas, 1943
- (60) WOOLDRIDGE, L.C. The Practitioner,
36, 187 (1886)
(Zitiert nach (41))

L e b e n s l a u f

Als Sohn des Arztes Dr. F. Ludwig Silbernagl und seiner Frau Eva, geborene Seeger, wurde ich, Stefan Silbernagl, am 7. Februar 1939 in Berlin geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich im wesentlichen in Obergermaringen/Kreis Kaufbeuren, wohin meine Familie evakuiert worden war, und besuchte dort die Volksschule. Seit 1950 lebte ich in Kaufbeuren/Allgäu und legte nach 9 Jahren Schulzeit am dortigen humanistischen Gymnasium das Abitur ab, um 1958 mit dem Studium der Elektrotechnik an der Technischen Hochschule in München zu beginnen. Im Herbst 1959 entschloß ich mich zum Medizinstudium, legte an der Münchener Universität nach 2 Semestern das Vorphysikum, nach 5 Semestern das Physikum und nach 11 Semestern, im Sommer 1965, das Staatsexamen ab.

Im August 1965 heiratete ich cand. med. Heidi Trendelenburg, Tochter des Dr. Reinhard Trendelenburg, ehemals o.ö. Professor der Forstwirtschaft an der Universität München.

Als Medizinalassistent war ich bisher an der Nervenklinik und an der I. Medizinischen Klinik der Universität München tätig.

